

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
FACULTAD POLITÉCNICA



**Simulación numérica de la electroforesis
bidimensional en geles de agarosa de dímeros
anudados y superenrollados mediante las ecuaciones
de Maxwell - Stefan**

*Tesis para obtener el grado de
Maestría en Ciencias de la Computación*

Autora:

María Cristina Parra Aguiar

Orientadora:

Dra. María José Fernandez De Nestosa

SAN LORENZO - PARAGUAY

JUNIO - 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Facultad Politécnica
Maestría en Ciencias de la Computación

**Simulación numérica de la electroforesis bidimensional en geles
de agarosa de dímeros anudados y superenrollados mediante las
ecuaciones de Maxwell - Stefan**

COMISIÓN EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge B. Schwartzman
Miembro examinador

Prof. DSc. Christian Emilio Schaerer Serra
Miembro examinador

Prof. Dr. Mariano David Bordas U.
Miembro examinador

Prof. Dr. María José Fernández De Nestosa
Miembro examinador

SAN LORENZO - PARAGUAY
2015

Resumen

En el presente trabajo se analizó la movilidad de dos familias topológicas: de los dímeros anudados y de los dímeros superenrollados de igual masa molecular, sometidos a electroforesis bidimensional en geles de agarosa en condiciones de alta concentración de agarosa y elevado potencial eléctrico en la segunda dimensión. Los datos experimentales se utilizaron para validar un modelo computacional que simula la electroforesis bidimensional utilizando las ecuaciones de Maxwell - Stefan para el transporte de masa. La ecuación resultante del modelado matemático, una ecuación diferencial parcial hiperbólica no lineal, se aproximó utilizando el esquema de Lax - Friedrich del método de diferencias finitas. Además, se realizaron conjeturas sobre los parámetros de mayor importancia en el fenómeno electroforético, donde se sugiere que la interacción entre la elasticidad y la compactación de las moléculas podría explicar las diferencias en la movilidad electroforética de los topoisómeros estudiados.

Palabras claves: electroforesis bidimensional, nudos, superenrollamiento, topología, ecuaciones de Maxwell-Stefan

Dedicatoria

*A mi familia,
gracias a su amor, apoyo y esfuerzo hoy me es posible
concluir esta etapa en la vida*

Agradecimiento

A todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto, muchas gracias por su apoyo y enseñanza.

En especial a mi orientadora de tesis, María José Fernandez De Nestosa, por su esfuerzo y dedicación.

A los profesores Christian Schaerer, Bernardo Schwartzman, Dora B. Krimer, Jorge Cebrián y Alicia Castán por el apoyo, orientación y mucha paciencia que me han brindado durante el proceso del desarrollo de esta Tesis.

Al Núcleo de Investigación y Desarrollo Tecnológico (NIDTEC) de la Facultad Politécnica de la Universidad Nacional de Asunción (FP - UNA).

Al Laboratorio de Biología Molecular de los Cromosomas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC de España.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

A mis compañeros Victor Martínez, Jorge Céspedes y José Kadomatsu por su ayuda y consejos.

Índice

Resumen	ii
Agradecimiento	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	ix
Abreviaciones	x
1 Introducción	1
1.1 Teoría de Nudos	2
1.1.1 Número mínimo de cruces	3
1.1.2 Notación de Alexander-Briggs y la tabla de Rolfsen	4
1.1.3 Quiralidad de los nudos	7
1.1.4 Superenrollamiento	8
1.1.5 Índice de ligamiento	8
1.1.6 Nudos ideales	9
1.1.7 Radio de giro	10
1.2 Topología del ADN y Teoría de nudos	11
1.3 Métodos de análisis de la topología del ADN	14
1.3.1 Electroforesis bidimensional en geles de agarosa	15
1.3.2 Movilidad electroforética de moléculas de ADN anudadas	16
1.4 Métodos de simulación computacional de la electroforesis de moléculas de ADN en gel	19
1.4.1 Modelo de redes	19
1.4.1.1 <i>Self-avoiding random walks, SAW</i>	20
1.4.1.2 <i>The cage model</i>	20
1.4.1.3 <i>The repton model</i>	21
1.4.2 Modelos numéricos	22

1.4.2.1	Ecuaciones de Maxwell - Stefan	23
1.4.2.2	Esquema de diferencias finitas	25
1.5	Relevancia del trabajo	27
1.6	Objetivo general	29
1.7	Objetivos específicos	29
2	Materiales y Métodos	30
2.1	Parte Biológica	30
2.1.1	Material biológico	30
2.1.1.1	Estirpes bacterianas:	30
2.1.1.2	Plásmidos	30
2.1.1.3	Condiciones de cultivo	31
2.1.2	Análisis de ADN	32
2.1.2.1	Electroforesis bidimensional en geles de agarosa	32
2.1.2.2	Transferencia del ADN a soportes sólidos (<i>Southern Blot</i>)	33
2.1.2.3	Marcaje e hibridación del ADN	34
2.1.2.4	Densitometría y determinación de la posi- ción relativa de los topoisómeros	35
2.2	Parte Computacional	35
2.2.1	Condiciones iniciales	37
2.2.2	Implementación computacional del esquema de difer- encias finitas	38
3	Resultados	41
3.1	Efecto del potencial electrostático sobre la movilidad elec- troforética de dímeros anudados y superenrollados	41
3.2	Efecto de la concentración de agarosa sobre la movilidad electroforética de dímeros anudados y superenrollados	52
4	Discusión	62
5	Conclusiones	68
A	Tabla de Rolfsen	77
B	Resultados Experimentales y Computacionales	79
C	Código del Programa	85
D	Presentaciones en congresos internacionales	90

Lista de Figuras

1.1	Nudos y enlaces	3
1.2	Movimientos de Reidemeister.	4
1.3	Tabla de Rolfsen (parcial)	5
1.4	Nudo compuesto	6
1.5	Convención de signos	7
1.6	Quiralidad de los nudos	7
1.7	Formas topológicas del ADN	11
1.8	Moléculas de ADN anudadas	13
1.9	Esquema de de migración de moléculas durante la electroforesis bidimensional	15
1.10	Movilidad electroforética en condiciones de primera dimensión de moléculas anudadas en función al ACN	17
1.11	Inmunodetección y representación gráfica de una electroforesis bidimensional en geles de agarosa de moléculas anudadas	18
1.12	Malla representativa para el esquema de diferencias finitas.	25
3.1	Electroforesis bidimensional en condiciones potencial electrostático variable	42
3.2	Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros anudados	44
3.3	Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros superenrollados.	45
3.4	Simulación computacional de la primera dimensión de la electroforesis bidimensional en geles de agarosa:	46
3.5	Simulación computacional de la electroforesis bidimensional a distintos voltajes durante la 2da dimensión	47
3.6	Comparación de los desplazamientos electroforéticos experimentales y las simulaciones computacionales de los dímeros superenrollados.	49

3.7	Comparación de los desplazamientos electroforéticos experimentales y las simulaciones computacionales de los dímeros anudados.	51
3.8	Electroforesis bidimensional con distintas concentraciones de agarosa en la 2da dimensión	53
3.9	Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros superenrollados respecto a las OCs	54
3.10	Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros anudados respecto a las OCs	55
3.11	Simulación computacional de la movilidad electroforética con distintas concentraciones de agarosa	57
3.12	Comparación de los desplazamientos electroforéticos experimentales y las simulaciones computacionales de los dímeros superenrollados	58
3.13	Comparación de los resultados experimentales con las simulaciones computacionales de la electroforesis bidimensional de dímeros anudados	60
A.1	Tabla de Rolsen	78

Lista de Tablas

3.1	Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético de dímeros superenrollados con la simulación en condiciones de potencial eléctrico variable.	50
3.2	Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético de dímeros anudados con la simulación numérica en condiciones de potencial eléctrico variable.	52
3.3	Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético experimental de dímeros superenrollados con la simulación numérica bajo distintas concentraciones de agarosa.	59
3.4	Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético experimental de dímeros anudados con la simulación numérica bajo distintas concentraciones de agarosa.	61
B.1	Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,0 % y 150 V	80
B.2	Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,0 % y 175 V	81
B.3	Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,0 % y 200 V	82
B.4	Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 0,8 % y 150 V	83
B.5	Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,2 % y 150 V	84

Abreviaciones

Wr	índice de superenrollamiento
Lk	índice de ligamiento
ΔC	grado de complejidad
u_α	fracción molar del componente α
u_β	fracción molar del componente β
v_α	velocidad molar del componente α
v_β	velocidad molar del componente β
D_β	difusividad del componente β
D_α	difusividad de del componente α
z_α	carga eléctrica elemental del componente α
z_β	carga eléctrica elemental del componente β
F	constante de Faraday
R	constante universal de los gases ideales
T	temperatura absoluta en Kelvin
$\nabla\phi$	potencial electrostático en V/m
z	dirección del avance de los topoisómeros, en m
R_α	término de reacción química del componente α
c	concentración molar total, en moles/ dm^3
c_α	concentración molar del componente α , en moles/ dm^3
t	tiempo

h	tamaño espacial de la malla
v^*	velocidad media molar del sistema
J^*_{α}	transporte molecular (o difusivo) de materia, en moles m^2s
k	fracción de tiempo considerado en el método de diferencias finitas empleado
O	error de truncamiento del método de aproximación empleado
a_{α}	actividad del componente α
V_{α}	Volumen molar parcial del componente α

Capítulo 1

Introducción

Sin lugar a dudas el descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN en 1953 por J. Watson y F. Crick ha sido uno de los hitos científicos más importantes de la historia. Desde entonces, muchas investigaciones se han centrado en el estudio de los procesos celulares que involucran a la molécula de ADN. Entre las principales funciones en las que participa directamente el ADN se encuentran la replicación, transcripción, recombinación y reparación. Todos estos procesos alteran, y a la vez son alterados, por la estructura topológica del ADN. La capacidad de la célula para controlar las alteraciones en la topología del ADN es esencial para su funcionamiento y supervivencia. Existe un grupo de enzimas que se encargan de regular la topología del ADN, las topoisomerasas. Estas enzimas son el blanco de varios agentes antimicrobianos y de los fármacos más utilizados contra el cáncer, tales como las camptotecinas, que impiden el desenrollamiento del ADN por la topoisomerasa I y se emplean en tumores malignos que son resistentes a otras terapias. Casi todas las formas de cáncer que se consideran curables mediante quimioterapia utilizan inhibidores específicos de la topoisomerasa II, tales como los etopósidos, doxorrubicina, etc. En

conjunto, estas observaciones refuerzan el potencial de las topoisomerasas como dianas terapéuticas. Sin embargo, el conocimiento que tenemos sobre la topología del ADN y cómo regulan las topoisomerasas los cambios topológicos sigue siendo muy limitado.

El Núcleo de Investigación y Desarrollo Tecnológico (NIDTEC) de la Facultad Politécnica de la UNA, junto con integrantes del laboratorio de Biología Molecular de los Cromosomas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de España han abordado esta problemática, desde un punto de vista multidisciplinario, donde se combinan técnicas de Biología Celular y Molecular con modelos matemáticos y simulaciones computacionales. El presente trabajo forma parte de este proyecto y consiste en el análisis del patrón de migración de moléculas de ADN circulares superenrolladas y anudadas sometidas a un proceso de electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Para tal fin, se implementó una simulación computacional que imita el proceso de electroforesis en geles de agarosa usando una ecuación de balance de masas en estado no estacionario y la ecuación de Maxwell-Stefan para el transporte de masa. Estas ecuaciones fueron acopladas y aproximadas mediante un esquema de Diferencias Finitas.

1.1 Teoría de Nudos

La topología es una rama de la matemática que implica el estudio de las propiedades de las figuras geométricas que permanecen inalteradas por deformaciones elásticas como el estiramiento o la torsión [1]. La teoría de nudos es un área de la topología que se ocupa del estudio de nudos y enlaces.

Matemáticamente se entiende por nudo, K , cualquier curva continua y cerrada en un espacio tridimensional euclídeo $\mathbb{R}^3$ [2]. El nudo más simple es la circunferencia, se lo denomina nudo trivial (*the unknot*).

Un **enlace** o **encadenado** es una colección finita, ordenada de nudos que no se intersectan entre sí. Cada nudo K_i es una componente del enlace [3].

Una método para estudiar los nudos es proyectándolos en un plano bidimensional y dibujando los cruces de forma que se distinga la sección del nudo que pasa por encima del punto de cruce de la sección que pasa por debajo. Estas proyecciones se conocen como proyecciones regulares o diagramas planos del nudo [2]. A partir de estas proyecciones se pueden determinar algunas cantidades que permanecen constante para cada nudo en particular, denominadas **invariantes de nudos** [3].

1.1.1 Número mínimo de cruces

Es un invariante que indica la menor cantidad de cruces observadas a partir de varias proyecciones planas de un nudo. El número mínimo de cruces del nudo trivial es cero [2, 3]. El número mínimo de cruces del siguiente nudo más simple, el de trébol (o *trefoil*), es tres (ver figura 1.1).

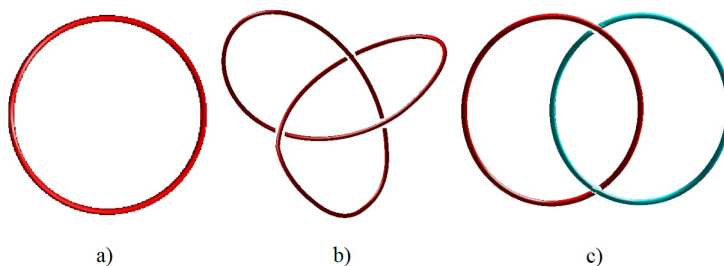


FIGURA 1.1: **Nudos y enlaces:** (a) La circunferencia o nudo trivial, no contiene cruces, (b) el nudo de trébol, cuyo número mínimo de cruces es tres y (c) un enlace compuesto por dos nudos triviales, cuyo número mínimo de cruces es dos.

A esta invariante podemos asociar otras dos características de los nudos: el **número promedio de cruces** (*Average Crossing Number, ACN*), el cual es el número promedio de cruces encontrados en todas las proyecciones planas posibles del nudo, indica el grado de complejidad del nudo; y el **número esencial de cruces**, que es la cantidad de lazos cerrados observados en la proyección plana del nudo [3, 4]. En el nudo trivial se observa un solo lazo, mientras que en el de trébol se observan tres lazos [2].

Los invariantes nos permiten determinar si dos nudos son o no equivalentes [5]. Si dos nudos son semejantes, sus invariantes son iguales y si los invariantes son diferentes, entonces los nudos no son semejantes. Otra forma de determinar si dos nudos son semejantes es aplicando el teorema de Reidemeister, según el cual dos nudos son semejantes si, y sólo si, un nudo se puede deformar en otro mediante una secuencia finita de movimientos de Reidemeister [2]. Los movimientos de Reidemeister se clasifican en tres tipos, estos se indican en la figura 1.2.

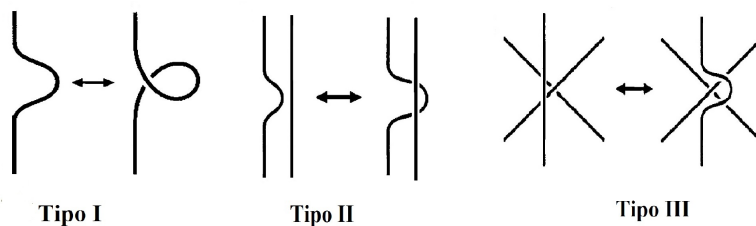


FIGURA 1.2: **Movimientos de Reidemeister:** el movimiento de tipo I permite agregar o sacar enrollamientos al nudo, el movimiento de tipo II nos permite agregar o sacar dos cruces y el de tipo III nos permite deslizar una hebra del nudo de un lado de un cruce al otro lado de ese cruce. Ref. ([1]).

1.1.2 Notación de Alexander-Briggs y la tabla de Rolfsen

Clasificar a los nudos según el número de cruces no es suficiente. En la figura 1.3 observamos que, si bien existe un solo nudo con tres cruces y un

solo nudo con cuatro cruces, a partir de cinco cruces la variedad de nudos con esa cantidad de cruces aumenta exponencialmente. La notación de Alexander-Briggs identifica los nudos en base al número mínimo de cruces mediante el símbolo: C_k , donde C es el número mínimo de cruces del nudo y el subíndice k indica su orden entre los nudos con ese número de cruce en la tabla de Rolfsen [6]. La tabla de Rolfsen (ver Apéndice A) clasifica todos los nudos primos de hasta 11 cruces [5]. En la figura 1.3 podemos apreciar una parte de esta tabla.

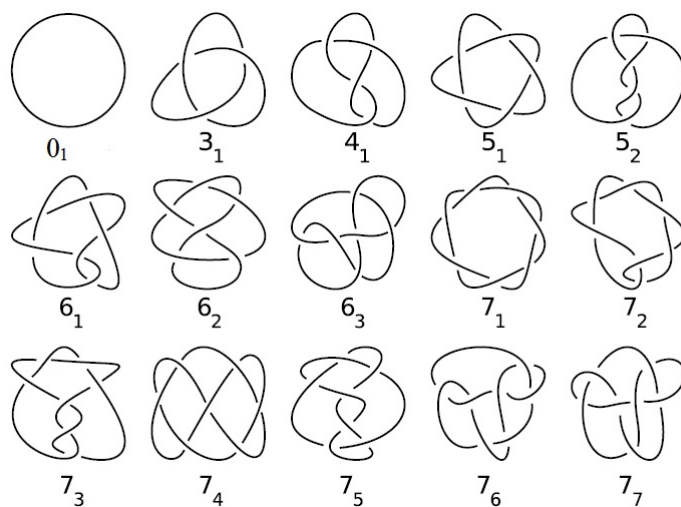


FIGURA 1.3: **Tabla de Rolfsen (parcial):** Nudos de hasta 7 cruces clasificados según la tabla de Rolfsen usando la notación de Alexander-Briggs. Ref [5].

Existen nudos que pueden representarse como la unión de dos o más nudos, estos son denominados **nudos compuestos**, un ejemplo es el nudo de la abuela (o *granny knot*), el cual es la unión de dos nudos de trébol y se denota por $3_1 \# 3_1$ (ver figura 1.4) [2]. Los nudos que no pueden formarse a partir de nudos más simples, son denominados **nudos primos**.

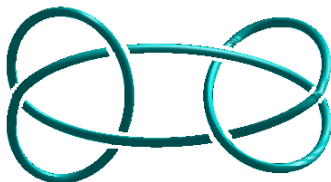


FIGURA 1.4: **Nudo compuesto:** El nudo de la abuela, $3_1 \# 3_1$, es un nudo de 6 cruces compuesto a partir de la unión de dos nudos de trébol.

Otra clasificación de nudos surge a partir de la manera en que estos pueden ser contruidos. Así tenemos los nudos toroidales y los nudos de torsión, (o *twist-knots*).

Los nudos toroidales $T(p, q)$: son los nudos no triviales que se obtienen al envolver una curva cerrada alrededor de un toroide sólido, p veces longitudinalmente al toroide y q veces en la dirección meridional [5]. Los valores p y q deben ser primos entre ellos y el número mínimo de cruces está dado por: $\min\{p.(q-1); (p-1).q\}$. El trébol es un nudo toroidal $T(2, 3)$ o $T(3, 2)$, ya que para todos los nudos toroidales se cumple que: $T(p, q) = T(q, p)$.

Los nudos de torsión se obtienen superenrollando repetidamente una curva cerrada y luego enlazando dos extremos cualesquiera [5].

El nudo 5_2 que se muestra en la 1.3 corresponde a un nudo de torsión y el 5_1 a un nudo toroidal, ambos con número mínimo de cruces igual a 5.

Si asignamos una orientación arbitraria a la proyección plana del nudo, podremos asignar a los puntos de cruces los valores (± 1) según el sentido de la rotación que se hace para alinear la flecha superior con la flecha inferior, ver figura 1.5. Si la rotación se hace en sentido horario, se asigna el valor -1 y si la rotación es en sentido antihorario, el valor asignado es $+1$ [1].

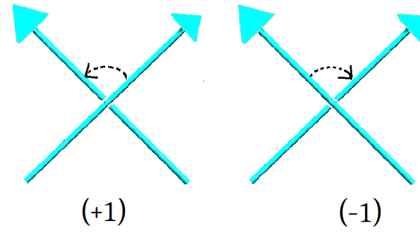


FIGURA 1.5: **Convención de signos:** El valor de $+1$ o -1 es asignado a cada cruce según el sentido de la rotación que hace la flecha superior para alinearse a la inferior.

Con esta notación podemos determinar algunas propiedades de los nudos.

1.1.3 Quiralidad de los nudos

Al aplicar sobre un nudo la transformación $(x, y, z) \rightarrow (x, y, -z)$, obtendremos su imagen especular. Si los signos de los cruces de un nudo y los de su imagen especular son todos iguales, se dice que el nudo es aquiral o simétrico. Caso contrario, se dice que es quiral (con orientación dextrógira o levógira) [7]. En la notación de Alexander-Brigg, se distingue un nudo de su imagen especular mediante un $*$, así: 3_1 es el nudo de trébol, y 3_1^* es la imagen especular del nudo de trébol, ver figura 1.6.

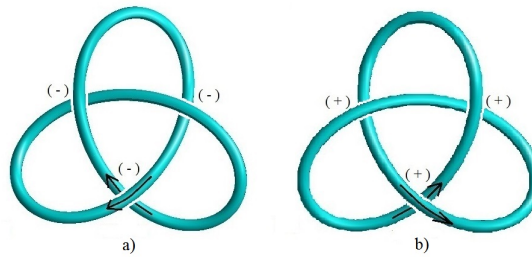


FIGURA 1.6: **Quiralidad de los nudos:** a) Nudo de trébol y b) su imagen especular. Se puede observar que mientras todos los signos en el nudo de trébol son negativos, los signos en su imagen especular son todos positivos.

1.1.4 Superenrollamiento

El **superenrollamiento** (*writhe*, Wr) es el número de veces que una curva se cruza sobre sí misma en el espacio tridimensional. Una curva superenrollada se puede transformar en un nudo trivial mediante sucesivos y finitos movimientos de Reidemeister de tipo I, por lo que en la teoría de nudos, una circunferencia y un superenrollamiento son equivalentes. Matemáticamente, el superenrollamiento se define como la integral doble de Gauss sobre una curva cerrada C en el espacio tridimensional [8]:

$$Wr = \frac{1}{4\pi} \int_C \int_C d\mathbf{r}_1 \times d\mathbf{r}_2 \cdot \frac{\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|^3} \quad (1.1)$$

donde $\mathbf{r}_1$ y $\mathbf{r}_2$ son dos puntos sobre la curva C .

En 2013, Brasher *y col.*, usaron simulaciones computacionales para cuantificar el superenrollamiento de moléculas anudadas con hasta nueve cruces y observaron que el valor del superenrollamiento es una cantidad que no depende de las dimensiones espaciales de la molécula, sólo del tipo de nudo que se tiene [7].

Los nudos aquirales tienen superenrollamiento igual a cero, mientras que los nudos quirales presentan igual valor absoluto, pero signo opuesto al de su imagen especular [7].

1.1.5 Índice de ligamiento

El índice de ligamiento (*linking number*, Lk), es un invariante topológico que mide que el grado de entrelazamiento entre los componentes de un enlace. En el caso de la molécula de ADN, el Lk mide el número de veces

que una hebra cruza sobre la otra. Matemáticamente es representada como la integral doble de Gauss:

$$Lk = \frac{1}{4\pi} \oint_{C_1} \oint_{C_2} \frac{\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|^3} \cdot (d\mathbf{r}_1 \times d\mathbf{r}_2). \quad (1.2)$$

Siendo $\mathbf{r}_1$ y $\mathbf{r}_2$ los vectores de posición ubicados en C_1 y C_2 . Esta integral es un número entero que cuenta el número de veces que una hebra se cruza con la otra cuando son proyectadas en un plano bidimensional.

Un algoritmo para determinar el índice de ligamiento de un enlace con dos componentes K_1 y K_2 a partir de una proyección bidimensional es contabilizar los n_i puntos de cruces observados en la proyección y asignar a cada punto de cruce el valor $+1$, o -1 según la convención de signos explicada anteriormente (figura 1.5). Entonces el número de enlace, estará dado por la media suma algebraica de todos los puntos de cruces dados por la proyección plana. Es decir:

$$Lk = \frac{\sum n_i}{2}. \quad (1.3)$$

1.1.6 Nudos ideales

Si en vez de considerar al nudo como una curva adimensional, se lo considera un ente físico con diámetro uniforme D y longitud L , la **forma ideal** de un nudo es la configuración geométrica que nos da la mayor proporción entre el volumen y la superficie de dicho nudo [9]. Esto es equivalente a determinar la longitud más corta con la que se puede formar un nudo. Mientras más cruces posea, más complejo es el nudo y más largo debe ser el tubo. De este concepto se desprende la razón L/D , que es una cantidad independiente de las dimensiones del tubo y puede ser usada para estudiar los nudos en

términos de su complejidad [10]. Uno de estos estudios fue el realizado por Katritch *y col.*, quienes mediante simulación computacional encontraron que existe una relación lineal entre la L/D y el número promedio de cruces o ACN de los nudos[9].

1.1.7 Radio de giro

Otra característica importante es la compactación de los objetos anudados. Una manera de medir la compactación de los polímeros ¹ es calculando su **radio de giro**, el cual sirve para describir las dimensiones de un polímero [11]. El radio de giro está dado por la raíz cuadrática media de la distancia entre los monómeros que conforman el polímero y el centro de masa.

El radio de giro de una molécula cuyos compontes tienen prácticamente la misma masa está definido por [12]:

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_{\text{mean}})^2,$$

donde r_{mean} es la posición media (o centro de masa) de los monómeros.

También puede expresarse como la raíz cuadrática media de la distancia entre los monómeros:

$$R_g^2 = \frac{1}{2N^2} \sum_{i,j} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)^2.$$

¹Polímero: compuesto químico, natural o sintético, formado por polimerización y que consiste esencialmente en la unión de unidades estructurales repetidas, denominadas monómeros.

1.2 Topología del ADN y Teoría de nudos

El ADN celular es una molécula larga y flexible, formada por una doble cadena de nucleótidos ², puede ser circular o lineal, pero incluso en este último caso, se encuentra ligada a estructuras celulares formando lazos cerrados (*loops*), por lo que se lo considera como un dominio topológico cerrado [13, 14]. La molécula de ADN puede presentarse en cualquiera de estas tres formas topológicas: superenrollada, anudada o encadenada a otra molécula de ADN (ver figura 1.7).

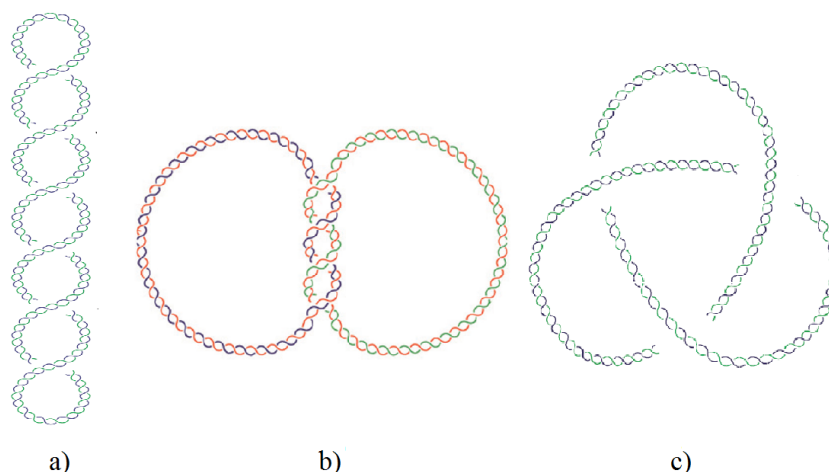


FIGURA 1.7: **Formas topológicas del ADN:** a) Esquema de un ADN circular superenrollado, donde una cadena de nucleótidos está representada por la línea verde y la otra por la línea azul, b) Esquema de una molécula de ADN (líneas roja y azul) encadenada a otra molécula de ADN (líneas roja y verde), c) Esquema de un ADN circular anudado, una cadena de nucleótidos está representada por la línea verde y la otra por la línea azul . Ref. [15, 16].

La disciplina que se encarga del estudio de estas formas topológicas y de las enzimas que las regulan, se denomina **Topología del ADN** [1]. En

²Los nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por un azúcar (la desoxiribosa), una de estas cuatro bases nitrogenadas: citosina (C), timina (T), adenina (A), guanina (G); y por un fosfato.

este trabajo nos centraremos en las moléculas de ADN anudadas y superenrolladas.

Las moléculas que presentan la misma composición química y el mismo tamaño, pero que difieren en su topología son denominadas **topoisómeros**.

En la naturaleza las moléculas circulares de ADN están naturalmente superenrolladas. Gracias a los trabajos de Jerome Vinograd, sabemos que si se produce una pequeña rotura en una de las cadenas, ésta podrá rotar libremente alrededor de la otra cadena, haciendo que el ADN pierda el superenrollamiento (movimiento de Reidemeister de tipo I) y quede totalmente relajado [17]. Por este motivo, desde el punto de vista biológico, un ADN circular relajado se considera como un topoisómero distinto a un ADN circular superenrollado.

Los nudos se pueden formar en el ADN durante los procesos de replicación, recombinación, transcripción y condensación. El equipo de James Wang fue el primero en observar que los nudos se pueden formar de manera natural en ADNs bicatenarios cuando estudiaron mediante microscopía electrónica el ADN del bacteriófago P2 recubierto con la proteína RecA [18]. En 1985, el equipo de Nicholas Cozzarelli logró observar varios nudos de hasta 9 cruces formados en un ADN circular por la topoisomerasa I [19]. En la figura 1.8 se observan imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de moléculas de ADN con nudos de 3, 4 y 5 cruces y su representación según la tabla de Rolfsen.

Varios fueron los experimentos realizados para dilucidar el mecanismo de formación de los nudos. Se sabe que las moléculas responsables de las roturas en la cadena de ADN, las topoisomerasas y las recombinasas de sitio-específico, son las causantes principales, pero aún no está completamente determinado el mecanismo y los lugares de actuación [20, 21]. Durante la

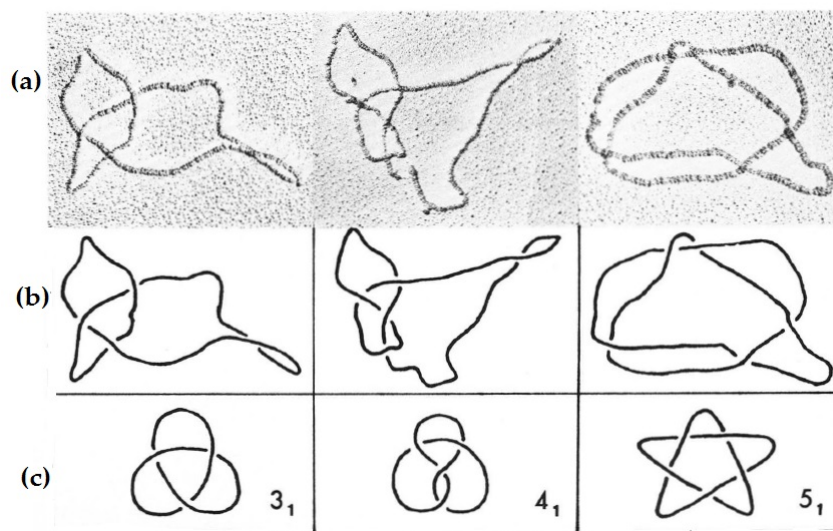


FIGURA 1.8: **Moléculas de ADN anudadas:** (a) imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica, (b) debajo de cada micrografía se muestra una representación que indica el tipo de cruce en cada nodo, y (c) en la parte inferior se tiene la representación ideal de cada nudo, junto a su notación de Alexander-Briggs. Ref [19].

replicación del ADN, las topoisomerasas se encargan de aliviar la tensión torsional que se acumula en el ADN delante de la horquilla de replicación [15, 22, 23]. Las topoisomerasas de tipo II realizan este trabajo, rompiendo momentáneamente la doble cadena para dejar pasar una hebra a través de la otra. Este procedimiento permite deshacer o invertir los cruces donde sea necesario. En 2011, López *y col.*, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, descubrieron que una topoisomerasa de tipo II, la Topo IV, es la responsable de crear y eliminar nudos en los intermediarios de replicación de plásmidos bacterianos [24]. Los responsables del estudio proponen que esta enzima crea accidentalmente los nudos cuando las hebras ya replicadas están débilmente entrelazadas, pero eventualmente se encarga de removerlos para que las hebras puedan segregarse una vez terminada la replicación. Los bacteriofagos también requieren de las topoisomerasas para anudar y desanudar sus ADN en el momento que estos infectan otras células [18, 25].

1.3 Métodos de análisis de la topología del ADN

Uno de los primeros métodos empleados para el análisis de moléculas de ADN fue la centrifugación en gradientes de densidad. Consiste en la separación de las partículas en función de su densidad de flotación. Este método se basa en el hecho de que las moléculas con mayor número de superenrollamiento son más compactas y por lo tanto sedimentan más rápido que las moléculas relajadas (sin superenrollamiento, $Wr=0$) [26].

Otro método utilizado es la microscopía electrónica, el cual permite visualizar moléculas y calcular el número de cruces. La desventaja de esta técnica es que la conformación de la molécula puede cambiar durante la preparación de la muestra. Además, resulta difícil determinar el signo de los cruces. Esta tarea se facilita engrosando la molécula de ADN mediante la utilización de la proteína RecA [27].

Una técnica de gran utilidad es la electroforesis que, al igual que la centrifugación en gradientes de densidad, separa las moléculas en base a la diferencia de forma entre las moléculas de ADN superenrolladas y relajadas. La electroforesis se define como el movimiento de una partícula cargada a través de una solución de electrolitos debido a un campo eléctrico externo aplicado[28]. La electroforesis en gel consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La molécula de ADN posee fosfatos cargados negativamente que, bajo la acción de un campo eléctrico en un gel con pH neutro, harán que la molécula migre hacia el electrodo positivo [3]. Si una muestra contiene ADN en varias formas topológicas, pero todos con la misma masa y longitud, la electroforesis en geles de agarosa permite la identificación de los topoisómeros presentes en la muestra, lo cual se logra determinando las posiciones relativas de los

topoisómeros en el gel [29].

1.3.1 Electroforesis bidimensional en geles de agarosa

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa consiste en dos electroforesis consecutivas, donde la primera dimensión se realiza en condiciones de baja concentración de agarosa y bajo potencial electrostático, favoreciendo la separación de las moléculas en función de su tamaño o nivel de compactación. La segunda dimensión se realiza de forma perpendicular a la primera. Y tanto el voltaje aplicado como la concentración de agarosa son mayores que los empleados en la primera dimensión. De esta manera, se favorece la separación de las moléculas en función a su forma [30].

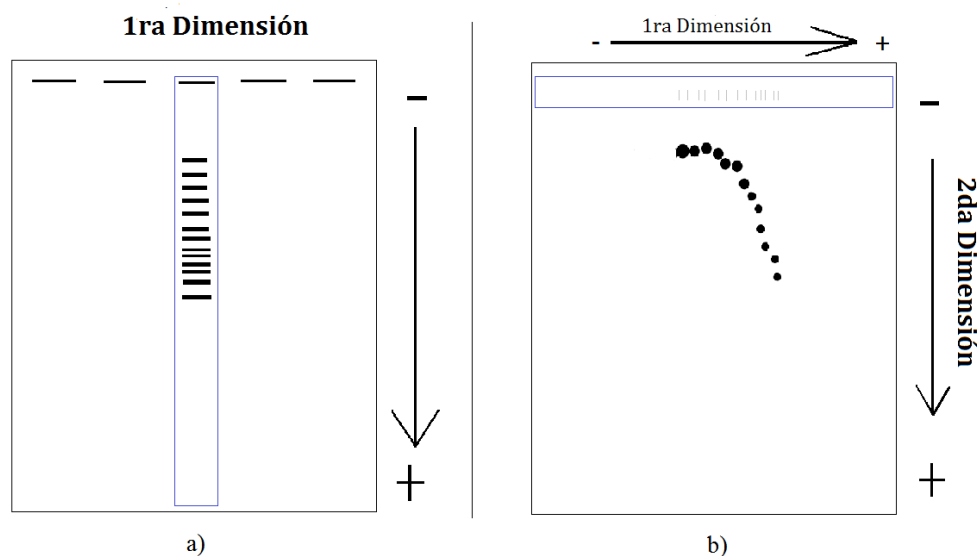


FIGURA 1.9: **Esquema de migración de moléculas durante la electroforesis bidimensional:** a) esquema de la electroforesis en primera dimensión, b) esquema de la segunda dimensión de la electroforesis, donde el carril de la 1ra dimensión es rotado 90°.

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa es una de las herramientas más utilizadas para analizar moléculas circulares de ADN aisladas de

varios organismos [17, 31]. Mediante este método se han podido identificar las moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas que se forman *in vivo* [32, 33, 15]. Además, es utilizado como un método preparativo para enriquecer muestras de ADN para moléculas específicas que serán analizadas posteriormente mediante microscopía electrónica o de fuerza atómica [33, 34, 35].

La agarosa, un coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal formado por la repetición de la unidad básica, la agarobiosa, que comprende unidades alternadas de galactosa y 3,6-anhidrogallactosa. Al gelificarse resulta en una malla tridimensional de canales cuyos diámetros van desde 50 a 200 nm [36]. La migración de las moléculas a través de este gel depende de varios factores: el tamaño de la molécula, la concentración de la agarosa, el voltaje aplicado, la presencia de agentes intercalantes, el tipo de tampón (o *buffer*) utilizado en la electroforesis, y la forma topológica de las moléculas. En este trabajo se analizará los efectos de la concentración de agarosa y del voltaje aplicado sobre la movilidad de moléculas anudadas y moléculas superenrolladas durante la electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

1.3.2 Movilidad electroforética de moléculas de ADN anudadas

A pesar del extenso uso de la electroforesis en geles de agarosa y de los numerosos experimentos realizados con el objetivo de comprender este fenómeno, todavía sabemos poco acerca de la dinámica de los polímeros en un gel. Los primeros experimentos sobre movilidad de moléculas anudadas en electroforesis en gel de agarosa fueron realizados por el equipo de Nicholas Cozzarelli [19]. En un estudio extensivo, en el cual usaron también microscopía electrónica, observaron que las moléculas anudadas de igual tamaño y

mismo número mínimo de cruces migraban todas con la misma velocidad. En 1996, Stasiak *y col.* demostraron que la velocidad electroforética en condiciones de bajo voltaje y baja concentración de agarosa presenta una relación aproximadamente lineal con el ACN de nudos ideales (ver figura 1.10) [10]. Sin embargo, los ADN anudados no adoptan configuraciones geométricas ideales, pero Vologodskii y colaboradores, demostraron que existe una relación lineal entre el coeficiente de sedimentación y el ACN de los ADN anudados [37]. Dado que este coeficiente es una medida de la compactación de las moléculas en solución, se deduce que las moléculas con mayor número de cruces, tienen mayor movilidad porque son más compactas, y esto facilita la migración a través de los poros del gel de agarosa.

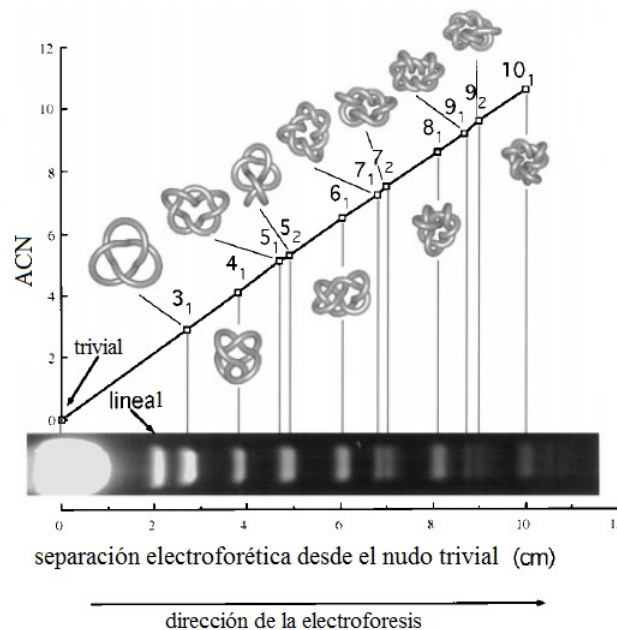


FIGURA 1.10: Movilidad electroforética en condiciones de primera dimensión de moléculas anudadas en función al ACN: Gráfico del desplazamiento de moléculas anudadas con respecto al nudo trivial en función al ACN. Se observa además la migración de las bandas correspondiente a cada tipo de nudo en el gel de agarosa. Modificado de [10].

Este panorama cambia radicalmente al realizar una electroforesis bidimensional en geles de agarosa, donde la segunda dimensión se realiza en condiciones de alto voltaje y con mayor concentración de agarosa que en la primera dimensión. Siendo la electroforesis bidimensional en geles de agarosa una técnica realizada en muy pocos laboratorios, son muy escasos los estudios de movilidad electroforética en estas condiciones que se enfocan en las propiedades topológicas de las moléculas de ADN. En un estudio, realizado por Sogo *y col.* (ver figura 1.11) se utilizó la electroforesis bidimensional en geles de agarosa para estudiar los nudos formados en intermediarios de replicación [38]. Las inmunodetecciones demostraron que en condiciones de primera dimensión, se constataban los resultados de Stasiak *y col.*, mientras que en segunda dimensión, el comportamiento fue el opuesto, las moléculas perdieron movilidad a medida que aumentaba el ACN.

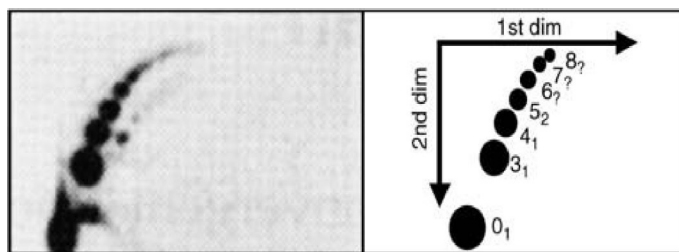


FIGURA 1.11: **Inmunodetección y representación gráfica de una electroforesis bidimensional en geles de agarosa de moléculas anudadas:** Burbujas de intermediarios de replicación anudados separados por sus números de cruces en un electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Modificado de [38].

Para entender este comportamiento, Weber *y col.* simularon el proceso de electroforesis usando *lattice* Monte Carlo [39]. Este método consiste en simular el gel de agarosa como una red bidimensional cuadrangular, y las moléculas con SAWs (*self-avoiding walks*) cerrados que se mueven según una red cúbica. Sus resultados confirmaron que la movilidad de los nudos

en geles de agarosa en primera dimensión está en relación directa con el ACN de las moléculas, mientras que en la segunda dimensión, la movilidad es inversa al ACN.

1.4 Métodos de simulación computacional de la electroforesis de moléculas de ADN en gel

1.4.1 Modelo de redes

Para el estudio de la electroforesis de ADN los métodos computacionales más extendidos son los que utilizan los modelos de redes (*lattice model*), donde el gel es representado mediante una red bidimensional con cuadrículas de tamaño uniforme, en el que cada cuadrícula representa el centro de un poro del gel [39, 40] y las moléculas son representadas como cadenas de partículas (monómeros) conectadas entre sí.

Con este método se demostró que si el campo eléctrico aplicado, ε , aplicado durante la electroforesis es débil, la velocidad del polímero es de la forma $v \sim \varepsilon/L$, siendo L la longitud del polímero, mientras que si el campo eléctrico es mayor, la velocidad deja de depender de la longitud y ya no es posible separar las partículas según su tamaño [41, 42]. Este régimen se conoce como colapso de banda, cuanto más largo son los fragmentos, menor será el umbral para llegar a este colapso.

La dinámica de la cadena polimérica está descrita por los movimientos de los monómeros, que van de un sitio de la red a otro cercano elegido al azar. Los modelos de redes más usados en el estudio de polímeros son:

- *Self-avoiding random walks*, o SAWs.
- *Cage model*.

- *Repton model*.

1.4.1.1 *Self-avoiding random walks, SAW*

En matemática un SAW es una secuencia de movimientos en una red que no visita el mismo punto más de una vez. En física computacional, cada paso del camino forma un nodo y las aristas que conectan los nodos tienen longitud constante, la representación de todos los nodos y sus aristas conforma un polímero. Los SAWs fueron introducidos por primera vez por el químico Paul Flory con el fin de modelar el comportamiento de polímeros y solventes de estructuras finas y alargadas, considerando el volumen de exclusión de las moléculas [43].

1.4.1.2 *The cage model*

En este modelo, el polímero es representado por una cadena de monómeros que están conectados entre sí mediante enlaces de longitud unitaria [44]. Los monómeros están colocados en el medio de las caras de una red bidimensional o tridimensional. Las hebras del gel son modeladas como obstáculos fijos en las redes que los polímeros no pueden atravesar. La dinámica consiste en mover individualmente un monómero en cada iteración, este modelo no impone auto-impedimiento (*self-avoidance*) en la cadena polimérica, pero prohíbe cualquier movimiento que permita al polímero atravesar las hebras del gel.

Este modelo fue extendido en 1986 por Olvera de la Cruz *y col.* para incluir los efectos de un campo eléctrico aplicado a lo largo de uno de los ejes principales de la red [45]. Esto se realizó aceptando o rechazando movimientos que desplazan a los monómeros en dirección contraria al campo aplicado

según el algoritmo de Metrópolis. Sus simulaciones en régimen de alto potencial eléctrico mostraron que el tiempo de relajación se incrementa exponencialmente con la intensidad del campo eléctrico.

1.4.1.3 *The repton model*

Introducido por Rubinstein en 1987 y adaptado para el estudio de electroforesis de ADN por Duke en 1989, describe los polímeros como cadenas de L monómeros conectados por $N = L - 1$ enlaces de longitud constante. En este modelo, las moléculas están confinadas de manera tal que el movimiento lateral de las mismas está restringido. La colección de todas las aristas de la red representan las hebras del gel. Si un polímero se mueve perpendicularmente respecto a su eje, será bloqueado por las hebras del gel. Para atravesar el gel, las moléculas deben reptar dentro de éste, a este tipo de movimiento se denomina *reptation*. La dinámica consiste en elegir un monómero aleatoriamente y tratar de moverlo arriba o abajo de la cadena siguiendo algunas reglas básicas: Un monómero interno está en una de las siguientes situaciones: a) en el mismo poro que sus dos vecinos más cercanos; b) los vecinos más cercanos están en poros adyacentes, o c) tiene un vecino en el mismo poro y otro en un poro adyacente. Si el monómero está en el estado (a) o (b), no puede realizar ningún movimiento. Si está en (c), el único movimiento permitido es la unión al monómero en el poro adyacente.

Los monómeros externos pueden estar en uno de estos estados: el vecino más cercano está en un poro adyacente o en el mismo poro. En el primer caso, el monómero puede unirse a su vecino en el poro adyacente. En el segundo caso, el monómero es libre de moverse a cualquiera de los poros adyacentes.

La gran desventaja que presentan estos modelos es el alto costo computacional de los mismos. Otro enfoque computacionalmente menos costoso es la utilización de métodos numéricos.

1.4.2 Modelos numéricos

Podemos considerar la electroforesis en geles de agarosa como un proceso difusivo donde, además del gradiente de concentración, se tiene un potencial eléctrico constante que fuerza a las moléculas a migrar de una región a otra del gel. Los métodos utilizados más comúnmente para describir la difusión de partículas en un sistema son la Ley de difusión de Fick y la Ley de Maxwell-Stefan.

La ley de Fick describe la difusión en un sistema multicomponente respecto a la diferencia en la concentración de cada componente del sistema [46]

$$J_i = -D \frac{\partial C_\alpha}{\partial x}, \quad (1.4)$$

donde C_α es la concentración molar del componente α , J_i es el flujo de α , D es el coeficiente de difusión de Fick y x es la dimensión espacial de la difusión.

La ley de Fick la proporciona una aproximación razonable del proceso de difusión en muchas situaciones comunes. Sin embargo, este método es a veces demasiado simple. La magnitud de flujo no depende solamente del gradiente de concentración, por lo que es necesario estudiar el efecto de otras fuerzas sobre la difusión. Un método más general está dado por las ecuaciones de Maxwell-Stefan.

1.4.2.1 Ecuaciones de Maxwell - Stefan

Las ecuaciones de Maxwell-Stefan, método desarrollado originalmente para estudiar la difusión en sistemas gaseosos multicomponentes, está dada por [47, 48]

$$\sum_{\beta=1, \beta \neq \alpha}^N \frac{u_\alpha u_\beta}{D_{\alpha\beta}} (v_\alpha - v_\beta) = -u_\alpha \nabla_{T,p} \ln a_\alpha - u_\alpha \left(\frac{\bar{V}_\alpha}{RT} \right) \nabla p - u_\alpha z_\alpha \left(\frac{F}{RT} \right) \nabla \phi, \quad (1.5)$$

donde u_α representa la fracción molar del componente alfa (α),

$D_{\alpha\beta}$ el coeficiente de difusividad de Maxwell - Stefan de la componente α respecto al β ,

v_α representa la velocidad de la componente α ,

$\nabla_{T,p} \ln a_\alpha$ es el gradiente a presión y temperatura constante del logaritmo natural de la actividad,

$\bar{V}_{\alpha\beta}$ es el volumen molar parcial de la especie α ,

R es la constante universal de los gases ideales (8.314 J/molK),

T es la temperatura absoluta en Kelvin,

∇p es el gradiente de presión,

z_α es la carga eléctrica elemental de la especie alfa,

F es la constante de Faraday (96485 coulombs/equivalentegramo) y

$\nabla \phi$ es el gradiente de potencial electrostático.

El término de la izquierda refiere a la velocidad de transporte de la especie α , siendo éste igual a la suma de todos los términos de la derecha; el primer término de la derecha representa la contribución del gradiente de concentración; el segundo representa el transporte por un gradiente de presión y el tercero el transporte por un gradiente de campo eléctrico. Los dos primeros términos de la derecha son descartados, pues la fuerza impulsora generada por el gradiente de concentración es despreciable en el caso de movilidad

en un gel y, como la electroforesis se lleva a cabo en posición perfectamente horizontal, incluso los efectos de presión debidos a la gravedad son eliminados [49].

El tercer término de la derecha es el que contiene la fuerza impulsora de transporte realmente significativo en la electroforesis. El mismo incluye al gradiente de potencial electrostático aplicado, que constituye una de las variables, junto a la concentración de la agarosa utilizada en la separación de topoisómeros de moléculas de ADN en el gel. Luego de la eliminación de los términos mencionados, la ecuación resultante es:

$$\sum_{\beta=1, \beta \neq \alpha}^N \frac{u_\alpha u_\beta}{D_{\alpha\beta}} (v_\alpha - v_\beta) = -u_\alpha z_\alpha \left(\frac{F}{RT} \right) \nabla \phi \quad (1.6)$$

Ahora, si consideramos que las únicas componentes en este proceso difusivo son las moléculas de ADN y los iones del tampón más la difusividad del gel, la ecuación 1.6 queda de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \frac{u_\alpha u_\beta}{D_{\alpha\beta}} (v_\alpha - v_\beta) + \frac{u_\alpha v_\alpha}{D_{\alpha g}} &= -u_\alpha z_\alpha \left(\frac{F}{RT} \right) \nabla \phi \\ \frac{u_\beta u_\alpha}{D_{\alpha\beta}} (v_\beta - v_\alpha) + \frac{u_\beta v_\beta}{D_{\beta g}} &= -u_\beta z_\beta \left(\frac{F}{RT} \right) \nabla \phi. \end{aligned} \quad (1.7)$$

Para tratar este sistema de ecuaciones diferenciales Kadomatsu *y col.* realizaron un balance de masas y expresaron las velocidades v_α y v_β en función a las variables propias del experimento. De este modo, el sistema queda expresado por la ecuación:

$$\frac{\partial u_\alpha}{\partial t} + \nabla \left(u_\alpha^2 (v_\alpha - v_\beta) + u_\alpha v_\beta \right) = 0. \quad (1.8)$$

Para la resolver esta ecuación se ha elegido el método de Lax - Friedrich del esquema de diferencias finitas.

1.4.2.2 Esquema de diferencias finitas

El método de diferencias finitas consiste en aproximar las derivadas parciales mediante cocientes de diferencias de los valores de las variables dependientes en un limitado número de puntos seleccionados [50]. Para tal fin, se divide el espacio de configuraciones (x, t) en una malla bidimensional, donde el eje horizontal corresponde a la variable espacial y el eje vertical corresponde a la variable temporal (ver figura 1.12). El eje horizontal se divide en segmentos de longitud $h = \Delta x = x_{i+1} - x_i$ y el eje vertical en segmentos de longitud $k = \Delta t = t_{j+1} - t_i$. Por tanto, la malla estará formada por (m_h, n_k) puntos siendo n y m enteros arbitrarios.

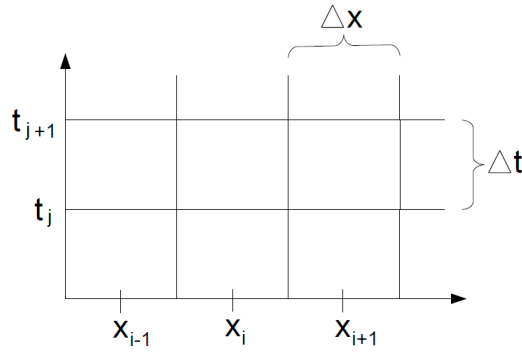


FIGURA 1.12: **Malla representativa para el esquema de diferencias finitas:** El eje horizontal del espacio de configuraciones se divide en segmentos de longitud $\Delta x = x_{i+1} - x_i$ y el eje vertical en segmentos de longitud $\Delta t = t_{j+1} - t_i$

Denotaremos por $u_{i,j}$ al valor de u en el punto (i, j) de la malla. La discretización en función a la variable espacial x se realiza aproximando la

derivada de primer orden de $u(x, t)$ en el punto $u_{i,j}$ según uno de los siguientes esquemas:

- Diferencia centrada: $\frac{\partial u}{\partial x} \approx \frac{u_{i+1,j} - u_{i-1,j}}{2h}$.
- Diferencia hacia delante o progresiva: $\frac{\partial u}{\partial x} \approx \frac{u_{i+1,j} - u_{i,j}}{h}$.
- Diferencia hacia atrás o regresiva: $\frac{\partial u}{\partial x} \approx \frac{u_{i,j} - u_{i-1,j}}{h}$.

Donde: $x_{i-1,j} = x_{i,j} - h$ y $x_{i+1,j} = x_{i,j} + h$.

Los valores de los puntos seleccionados se convierten en las incógnitas, por lo que la ecuación diferencial parcial que describe el problema es reemplazada por un número finito de ecuaciones algebraicas que deben ser resueltas.

La ecuación 1.8 es una ecuación diferencial parcial hiperbólica, no lineal de la forma:

$$\frac{\partial u}{\partial t} + \frac{\partial f(u)}{\partial x} = 0, \quad (1.9)$$

donde $f(u)$ está dado por: $f(u) = u_\alpha^2(v_\alpha - v_\beta) + u_\alpha v_\beta$.

El método utilizado en esta tesis para resolver esta ecuación es el esquema de Lax-Friedrichs, a veces llamado también esquema difusivo, que aplicado a la ecuación anterior queda de la forma: [51],

$$u_{i,j+1} = \frac{1}{2} (u_{i+1,j} + u_{i-1,j}) - \frac{\Delta t}{2 \Delta x} [f(u_{i+1,j}) - f(u_{i-1,j})]. \quad (1.10)$$

siendo:

$$f(u_{i-1,j}) = 0.5 \left[u_{i-1,j}^2 (v_{i-1,j} - v_\beta) + u_{i,k}^2 (v_{i,j} - v_\beta) + (u_{i-1,k} + u_{i,k}) v_\beta \right] \text{ y}$$

$$f(u_{i+1,j}) = 0.5 \left[u_{i+1,j}^2 (v_{i+1,j} - v_\beta) + u_{i,j}^2 (v_{i,j} - v_\beta) + (u_{i+1,k} + u_{i,k}) v_\beta \right].$$

Se demostró que este sistema es convergente, bajo las siguientes condiciones: siempre que $k^{-1}h^2 \rightarrow 0$ (condición de consistencia) y si $|a(u_m, t_n)| \frac{k}{h} \leq 1$ para todos los valores (t_n, u_m) en el dominio de cómputo (condición de estabilidad) [49].

1.5 Relevancia del trabajo

Una cuestión aparentemente trivial es la comprensión de los cambios topológicos que experimentan las moléculas el ADN. Si bien es amplio el conocimiento que se tiene al respecto, éste sigue siendo muy limitado. Esto se debe en gran parte, a la dificultad de estudiar el comportamiento de las moléculas de ADN *in vivo* mediante instrumentos de alta resolución. En este aspecto, la técnica que ha resultado ser más útil es la electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Sin embargo, debemos recordar que con esta técnica no estamos observando directamente las moléculas y, por lo tanto, la interpretación de las señales observadas en las inmunodetecciones depende enormemente del conocimiento que tenemos acerca del patrón (o perfil) de migración de las variedades topológicas que deseamos analizar.

En el presente proyecto se combinaron experimentos de electroforesis bidimensional en geles de agarosa con simulación computacional para analizar el patrón de migración de moléculas ADN circulares superenrollados y moléculas de ADN anudadas con el objetivo de identificar los parámetros que determinan la movilidad electroforética de estas familias topológicas. Para ello se implementó una simulación computacional que imita el proceso de electroforesis en un gel de agarosa utilizando una ecuación de balance de masas en estado no estacionario y la ecuación de Maxwell-Stefan para el

transporte de masa. Estas ecuaciones fueron acopladas y aproximadas mediante un esquema de Diferencias Finitas, específicamente por el método de Lax – Friedrich. Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos experimentales con el fin de validar las simulaciones numéricas.

1.6 Objetivo general

- Simular la movilidad electroforética de moléculas de ADN correspondientes a dímeros superenrollados y dímeros anudados.

1.7 Objetivos específicos

- Analizar la movilidad electroforética de moléculas de ADN de dímeros superenrollados y dímeros anudados mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa.
- Simular la electroforesis bidimensional en geles de agarosa de moléculas de ADN de dímeros superenrollados y dímeros anudados en distintas condiciones de potencial electrostático y concentración de agarosa.
- Comparar los resultados de la electroforesis bidimensional en geles de agarosa y la simulación numérica.
- Identificar parámetros que permitan explicar la diferencia de movilidad electroforética de moléculas con igual masa e igual número de cruces pero distinta topología en condiciones de alta concentración de agarosa y elevado potencial electrostático.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Parte Biológica

2.1.1 Material biológico

2.1.1.1 Estirpes bacterianas:

Las estirpes de *E. coli* usadas en este estudio fueron:

- **pBR18ParE10:** W3110F - except[*parE10recA*], cedida por Ian Grainge.
- **pBR18 LZ38:** F-*lambda*(*P80redl14xis-l-cl857*)*zei-723 :: Tn10parCK84 :: kan*, gentileza de Lynn Zechiedrich.

2.1.1.2 Plásmidos

pBR18 (4383 pares de bases o *bp*): derivado del pBR322 en el cual el promotor del gen de resistencia a tetraciclina fue sustituido por la región *polylinker* de pUC18 [52]. Las estirpes bacterianas se transformaron con formas monoméricas (4384 bp) o diméricas (8766 bp) del plásmido pBR18.

2.1.1.3 Condiciones de cultivo

La estirpe LZ38 se cultivó en medio LB¹ a 37°C, mientras que la estirpe ParE10 se cultivó en el mismo medio a 30°C. En todos los casos se agregó 75 µg/ml de ampicilina al medio LB.

Se utilizó norfloxacin para inhibir las topoisomerasas bacterianas de tipo II: ADN Girasa y Topoisomerasa IV (Topo IV) tal como se describe en [53] y [54]. El uso de mutantes resistentes a esta droga permitió inhibir selectivamente estas topoisomerasas. Las células se cultivaron en presencia de 15 µM de norfloxacin durante 15-30 minutos antes de la extracción de ADN.

Para obtener dímeros superenrollados se transformó la cepa LZ38 con el plásmido pBR18. Esta estirpe es recA+ y, por lo tanto, acumula formas monoméricas y multiméricas del plásmido. Esta cepa posee además una mutación en el gen ParC que hace que la Topo IV sea resistente a la norfloxacin, de manera que al crecer las células en presencia de esta droga se inhibe sólo la ADN Girasa, pero no la Topo IV [55], [15]. De esta manera al cultivar las células en presencia de norfloxacin se consiguió acumular monómeros y dímeros con bajo nivel de superenrollamiento sin que aparezcan encadenados.

Para visualizar los dímeros anudados, se transformaron células de *E. coli* parE10 con dímeros del plásmido pBR18, y las células se cultivaron en presencia de 15 µM de norfloxacin para relajar parcialmente las moléculas superenrolladas no replicadas [15]. De esta forma se pudieron observar en el mismo gel, dímeros anudados y superenrollados.

¹triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro sódico 1%, pH 7.5

Las muestras de ADN analizadas se prepararon a partir de mezclas *in vitro* de moléculas de ADN superenrolladas y anudadas.

2.1.2 Análisis de ADN

2.1.2.1 Electroforesis bidimensional en geles de agarosa

Primera dimensión En todos los casos la primera dimensión se llevó a cabo en geles de agarosa SeaKem LE (Lonza) a una concentración de 0.4% y se corrió a $1.0V/cm$ durante 25 ó 30 horas. Tanto en primera como en segunda dimensión, se utilizó Tris-Borato-EDTA(TBE) 1x como solución tampón.

Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN del bacteriófago $\lambda - HindIII$ (Fermentas) que sirvió para identificar las posiciones de los topoisómeros en el gel.

La agarosa al 0.4 % preparada en tampón TBE 1x, se vertió en un molde y se dejó polimerizar durante una hora. Una vez que el gel polimerizó, se introdujo en una cubeta de electroforesis con TBE 1x y se cargaron las muestras de ADN y el marcador $\lambda - HindIII$. Finalmente se conectó la cubeta a una fuente de tensión, y las muestras se corrieron durante 25 ó 30 horas a temperatura ambiente.

Una vez finalizado este proceso, los geles se incubaron en una solución de bromuro de etidio (Sigma) a una concentración de $1 \mu g/ml$ y se examinaron en un transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm de longitud de onda (Bio Rad).

Segunda dimensión Una vez terminada la primera dimensión, se cortaron las calles del gel donde corrieron las muestras y se giraron 90° , de modo que quedaron en dirección perpendicular al campo eléctrico (ver figura 1.2.3). Seguidamente, se agregó la agarosa de mayor concentración y se esperó una hora para que el gel polimerice. Una vez transcurrido este tiempo, el gel se introdujo en la cubeta de electroforesis y las muestras se corrieron en cámara fría, a $4^\circ C$, según las condiciones indicadas a continuación:

- 1.0% de agarosa a 5.00 V/cm por 16 horas;
- 1.0% de agarosa a 5.83 V/cm por 11 horas;
- 1.0% de agarosa a 6.67 V/cm por 8 horas;
- 0.8% de agarosa a 5.00 V/cm por 10 horas;
- 1.2% de agarosa a 5.00 V/cm por 22 horas;

2.1.2.2 Transferencia del ADN a soportes sólidos (*Southern Blot*)

Una vez terminada la electroforesis, las muestras se desnaturalizaron tratando el gel de agarosa con 0.25M de HCl por 15 minutos. Seguidamente, el ADN se transfirió a la superficie de una membrana de nylon (*Nylon Membranes positively charged*, Roche) de acuerdo al protocolo de transferencia alcalina descrito por López-Estraño y col [56].

2.1.2.3 Marcaje e hibridación del ADN

Marcaje de sondas de ADN no radiactivas: Las sondas de ADN se marcaron con digoxigenina ² utilizando el kit de marcaje no radiactivo *DIG-High Prime* (Roche), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Hibridación con sondas de ADN no radiactivas: El proceso de hibridación consistió en, primeramente pre-hibridar la membrana, colocándola en 200 ml de solución de pre-hibridación (leche descremada al 0.5 %, *saline-sodium citrate* SSPE X2, SDS al 1.0 %, sulfato de dextrano al 10 % y 0.5 mg/ml de ADN de espermatozoos de salmón sonificado y desnaturalizado) a 65°C por 4 a 6 horas. Seguidamente, la hibridación se realizó añadiendo la sonda desnaturalizada e incubándola con la membrana por alrededor de 16 horas a 65°C. Una vez transcurrido ese tiempo la membrana fue sometida a dos lavados sucesivos, de 15 minutos cada uno, con SSC x2 y SDS 0.1 %, y dos lavados, de 15 minutos cada uno, en una solución de SSC 0.1x y SDS 0.1 (la última precalentada a 65°C).

Finalmente, se realizó la detección utilizando un anticuerpo conjugado (Anti-Digoxigenin-AP de Roche) y un sustrato quimioluminiscente (CDP-Star, PerkinElmer) según el protocolo descrito por la casa comercial, para su posterior revelado en películas de fotografías, obteniendo así las inmunodetecciones.

²Sustancia de bajo peso molecular que contiene un determinante antigénico que puede unirse a un anticuerpo específico

2.1.2.4 Densitometría y determinación de la posición relativa de los topoisómeros

De las inmunodetecciones se obtuvieron dos medidas: el desplazamiento de los topoisómeros y la densidad de los topoisómeros. El análisis densitométrico se realizó utilizando el programa informático *NIH ImageJ*. Para ello se escanearon las películas según el manual del programa y se determinó el área y grado de saturación de cada topoisómero.

Los valores del desplazamiento se obtuvieron midiendo la distancia en centímetros (cm) de cada topoisómero con respecto a una señal común a todos los geles. En este caso se tomó como referencia el topoisómero correspondiente al nudo trivial, sin superenrollamiento, denominado OC (*Open Circle*).

2.2 Parte Computacional

Para simular el proceso electroforético se asumió que el gel de agarosa es un medio poroso, homogéneo y suficientemente rígido como para no sufrir modificaciones en su volumen durante el proceso de la electroforesis. La influencia del gel (porosidad e incluso interacciones electrostáticas) se encuentra considerada en el valor del coeficiente de difusividad D_β . Para simplificar la notación, se usaron las letras α (alfa) para simbolizar la molécula de ADN y β (beta) para los iones de la solución tampón.

Siendo la electroforesis bidimensional en geles de agarosa un proceso que consiste en dos electroforesis unidimensionales consecutivas, se simuló el proceso resolviendo las ecuaciones de transporte de masa unidimensional

de Maxwell - Stefan bajo dos condiciones: una de bajo voltaje y baja concentración de agarosa, que corresponde a la electroforesis en primera dimensión, y otra de mayor voltaje y mayor concentración de agarosa, para la segunda dimensión.

La ecuación que representa el proceso de electroforesis unidimensional en geles de agarosa está dada por:

$$\frac{\partial}{\partial t} u_{\alpha} + \nabla \left(u_{\alpha}^2 (v_{\alpha} - v_{\beta}) + u_{\alpha} v_{\beta} \right) = 0. \quad (2.1)$$

Donde u_{α} representa la fracción molar correspondiente a las moléculas de ADN, v_{α} representa la velocidad de los plásmidos y v_{β} la de los iones de la solución tampón.

Ésta es una ecuación diferencial parcial hiperbólica de la forma siguiente:

$$\frac{\partial}{\partial t} u + \frac{\partial}{\partial x} f(u) = 0. \quad (2.2)$$

Como se explicó en la sección 1.3.2 para resolver numéricamente este proceso se utilizó el esquema de Lax-Friedrichs para diferencias finitas, en una malla que contiene (nk, mh) puntos donde n y m son enteros arbitrarios y se escogieron los valores de h y k tal que $h/t < 1$ para garantizar la convergencia del método.

La solución final quedó de la forma:

$$u(i, j+1) = \frac{1}{2} (u_{i-1,j} + u_{i+1,j}) - \frac{t}{2h} (F_R - F_L), \quad (2.3)$$

En donde $u_{i,j}$ denota el valor de $u = u_{\alpha}$ en el punto (i, j) de la malla,

$h = x_{i+1} - x_i$ representa incremento espacial de la malla,

$k = t_{j+1} - t_j$, el incremento en el tiempo.

$$F_L = 0.5 \left[u_{i-1,j}^2 (v_1 - v_\beta) + u_{i,j}^2 (v_2 - v_\beta) + (u_{i-1,j} + u_{i,j}) v_\beta \right] \text{ y}$$

$$F_R = 0.5 \left[u_{i+1,j}^2 (v_3 - v_\beta) + u_{i,j}^2 (v_2 - v_\beta) + (u_{i+1,k} + u_{i,j}) v_\beta \right].$$

las aproximaciones a las derivadas en sus formas regresiva y progresiva, respectivamente.

2.2.1 Condiciones iniciales

A partir de las inmunodetecciones de la parte experimental pudimos obtener la fracción molar (u_α) de cada topoisómero, y la velocidad de migración de los mismos, (v_α). La fracción molar se determinó a partir del análisis densitométrico indicado en la sección anterior (2.1.2.4) y v_α se calculó dividiendo el desplazamiento de cada uno de los topoisómeros por el tiempo de duración de la electroforesis y realizando un regresión polinómica que relaciona estas velocidades con el grado de complejidad (ΔC) de los topoisómeros.

Debido a que en los experimentos realizados no es posible determinar la velocidad de migración de la especie β (moléculas del tampón TBE) se consideró a v_β como un múltiplo de v_α .

A partir de los datos obtenidos de las inmunodetecciones se determinó el valor de la difusividad de cada topoisómero, utilizando la ecuación:

$$D_{\alpha g} = \frac{-v_\alpha \cdot u_\alpha}{C [u_\alpha z_\alpha + (1 - u_\alpha) z_\beta] + [1 - u_\alpha] \frac{v_\beta}{D_\beta}}. \quad (2.4)$$

Donde:

$$C = F \cdot E / (R \cdot T);$$

$F = 96485.34 \text{ C/mol}$ es la constante de Faraday;

V = voltaje utilizado

$E = V/0.15$ V/m es el valor del campo eléctrico;

$R = 8.314472$ J/mol.K es la constante universal gases;

$T = 293.16$ K denota la temperatura de trabajo;

$D_\beta = 3 * 10^{-10}$ es el valor de la difusividad del medio y

$z_\alpha = -38$ y $z_\beta = -3$ indican las cargas eléctricas elementales de las especies α y β , respectivamente.

Como se explicó anteriormente, la electroforesis bidimensional consiste en dos electroforesis unidimensionales consecutivas. Entonces para simular este proceso se corrió el algoritmo dos veces. En la primera corrida se simuló la primera dimensión, siendo $V = 30$ y se asignó el origen de coordenadas como el origen de posiciones de todos los topoisómeros. En la segunda corrida se simularon las condiciones de segunda dimensión, los parámetros a utilizar se indican en la sección (2.1.2.1), mientras que para el origen de posiciones de los topoisómeros en la segunda dimensión se tomaron la posición final obtenida en la primera dimensión.

2.2.2 Implementación computacional del esquema de diferencias finitas

Una vez determinado los parámetros iniciales, se determinó la densidad de flujo que, bajo el esquema de diferencias finitas, resulta en el siguiente

conjunto de ecuaciones para los puntos $i + 1$, i , e $i - 1$:

$$\begin{aligned} D_{\alpha 1} &= \frac{-v_{\alpha} \cdot u_{i-1,k}}{C [u_{i-1,k} z_{\alpha} + (1 - u_{i-1,k}) z_{\beta}] + [1 - u_{i-1,k}] \frac{v_{\beta}}{D_{\beta}}}; \\ D_{\alpha 2} &= \frac{-v_{\alpha} \cdot u_{i,j}}{C [u_{i,j} z_{\alpha} + (1 - u_{i,j}) z_{\beta}] + [1 - u_{i,j}] \frac{v_{\beta}}{D_{\beta}}}; \\ D_{\alpha 3} &= \frac{-v_{\alpha} \cdot u_{i+1,k}}{C [u_{i+1,k} z_{\alpha} + (1 - u_{i+1,k}) z_{\beta}] + [1 - u_{i+1,k}] \frac{v_{\beta}}{D_{\beta}}}; \end{aligned}$$

Estos valores se utilizaron para determinar las velocidades de migración de los topoisómeros, que en diferencias finitas está dado por el siguiente conjunto de ecuaciones:

$$\begin{aligned} v_1 &= -C \cdot D_{\alpha 1} \left[z_{\alpha} - z_{\beta} + \frac{z_{\beta}}{u_{i-1,k}} \right] + \frac{D_{\alpha 1} v_{\beta}}{D_{\beta} u_{i-1,k}} [u_{i-1,k} - 1]; \\ v_2 &= -C \cdot D_{\alpha 2} \left[z_{\alpha} - z_{\beta} + \frac{z_{\beta}}{u_{i,j}} \right] + \frac{D_{\alpha 2} v_{\beta}}{D_{\beta} u_{i,j}} [u_{i,j} - 1]; \\ v_3 &= -C \cdot D_{\alpha 3} \left[z_{\alpha} - z_{\beta} + \frac{z_{\beta}}{u_{i+1,k}} \right] + \frac{D_{\alpha 3} v_{\beta}}{D_{\beta} u_{i+1,k}} [u_{i+1,k} - 1]; \end{aligned}$$

Esto finalmente nos permitió calcular sus posiciones finales:

$$u(i, k + 1) = \frac{1}{2} [u_{i-1,k} + u_{i+1,j}] - \frac{t}{2h} [F_R - F_L],$$

con

$$\begin{aligned} F_L &= 0.5 [u_{i-1,j}^2 (v_1 - v_{\beta}) + u_{i,j}^2 (v_2 - v_{\beta}) + (u_{i-1,j} + u_{i,j}) v_{\beta}] \\ F_R &= 0.5 [u_{i+1,j}^2 (v_3 - v_{\beta}) + u_{i,j}^2 (v_2 - v_{\beta}) + (u_{i+1,j} + u_{i,j}) v_{\beta}]. \end{aligned}$$

Para evitar sobrecargar la memoria los valores de la solución $(u_{i,j})$, se evitó almacenar las soluciones parciales más allá del tiempo que eran necesarios. Por este motivo se utilizaron dos vectores unidimensionales uno para almacenar los valores del tiempo anterior, u_{old} , y otro para almacenar los

valores del tiempo actual, u_{new} . Después de que u_{new} ha sido calculado para todo m , luego u_{old} debe ser reasignado a u_{new} , y el paso del tiempo es incrementado al siguiente valor.

Para comparar los resultados obtenidos mediante las simulaciones con los resultados experimentales se calculó el error porcentual utilizando la siguiente ecuación:

$$e_r = \frac{|x_e - x_s|}{x_e} \cdot 100\%, \quad (2.5)$$

donde x_e indica los desplazamientos obtenidos experimentalmente y x_s los desplazamientos obtenidos a partir de la simulación.

Capítulo 3

Resultados

Con el fin de analizar la movilidad electroforética de los dímeros anudados y superenrollados, se realizaron electroforesis bidimensionales en geles de agarosa para analizar moléculas circulares de ADN provenientes del plásmido pBR18. Los datos obtenidos se utilizaron para validar la simulación computacional que se realizó empleando la ecuación de transporte de masas de Maxwell - Stefan mediante el esquema de diferencias finitas de Lax-Friedrich. En todos los casos, las primeras dimensiones se llevaron a cabo en condiciones estándar de baja concentración de agarosa y bajo potencial eléctrico, mientras que en la segunda dimensión se aumentaron tanto los valores del voltaje como los de la concentración de agarosa del gel.

3.1 Efecto del potencial electrostático sobre la movilidad electroforética de dímeros anudados y superenrollados

Con el fin de estudiar el perfil de migración en condiciones de alto voltaje durante la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional en geles de agarosa, se mantuvo constante la concentración de agarosa y se emplearon

distintos voltajes. En la figura 3.1 se muestran las inmunodetecciones correspondientes a tres geles bidimensionales cuyas segundas dimensiones se realizaron en condiciones de 1% de agarosa y distintos potenciales electrostáticos.

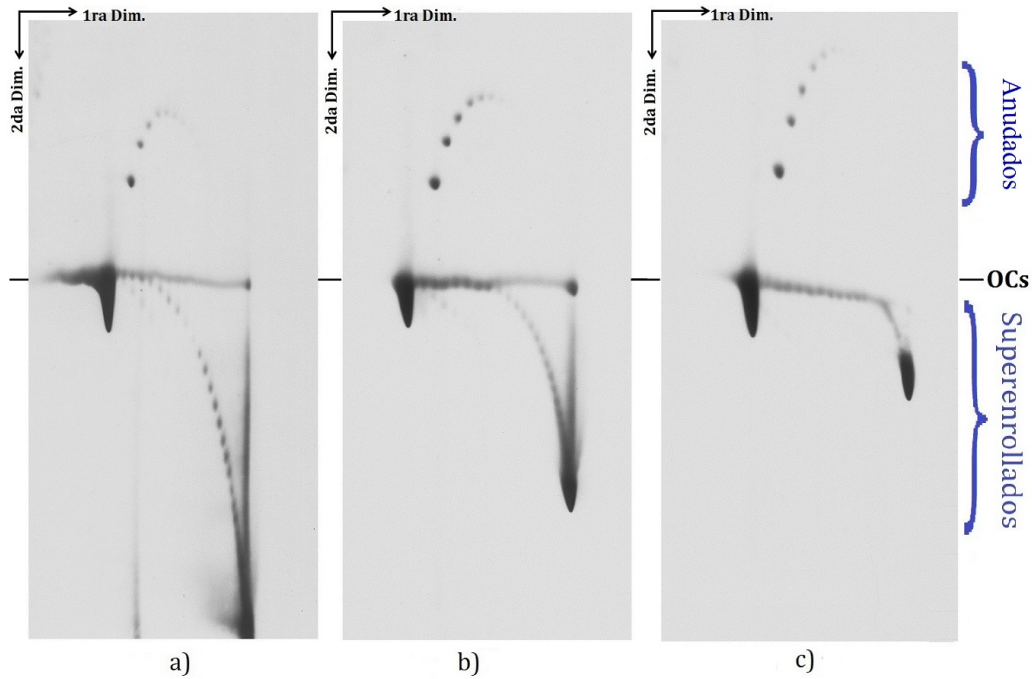


FIGURA 3.1: Electroforesis bidimensional en condiciones de potencial electrostático variable: La primera dimensión se realizó en geles de agarosa al 0.4% y se corrió a 30 V. Las segundas dimensiones se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1% y se corrieron a 150 V (a), 175 V (b) y 200 V (c).

Se puede observar que cada inmunodetección contiene dos arcos de señales, el arco superior corresponde a los plásmidos diméricos anudados y el arco inferior a los dímeros superenrollados. Se observa además una señal común en todos los geles, que corresponde a las OCs (*Open Circles*), que son los plásmidos con superenrollamiento nulo.

La dirección de migración de las moléculas en primera dimensión es de izquierda a derecha, las señales que están a la derecha corresponden a moléculas de ADN con mayor velocidad. El sentido de la migración durante la segunda dimensión es de arriba hacia abajo, por lo que las señales que están más abajo corresponden a moléculas de ADN con mayor velocidad.

Debido a que un aumento en el potencial electrostático se traduce en un aumento de la velocidad de los topoisómeros, el tiempo de corrida para cada voltaje fue diferente, el gel a 150 V corrió durante 16 horas, el gel a 175 V corrió durante 11 horas y el gel a 200 V corrió durante 8 horas. Estos tiempos se determinaron, en algunos casos, observando la migración de plásmidos pBR322 que fueron utilizados como marcadores y, en otros casos, usando valores determinados en experimentos similares. Para compensar estas discrepancias en los tiempos, las mediciones se normalizaron respecto a la señal de OCs. Esto se realizó midiendo el desplazamiento (en *cm*) de los topoisómeros respecto a la señal de las OCs; luego se dividieron estas distancias por el número de horas que corrieron las muestras y, de este modo, se obtuvo la velocidad de migración de cada topoisómero con respecto a las OCs. Este procedimiento se realizó tanto para la primera como para la segunda dimensión. Las figuras 3.3 y 3.2 muestran las velocidades en función del ΔC , que es una medida del aumento del número de cruces o de la complejidad de los topoisómeros.

En la figura 3.2 se observa la velocidad de migración de los dímeros superenrollados con respecto a las OCs, mientras que en la figura 3.3 se muestra la velocidad de migración de los dímeros anudados respecto a la señal de OCs.

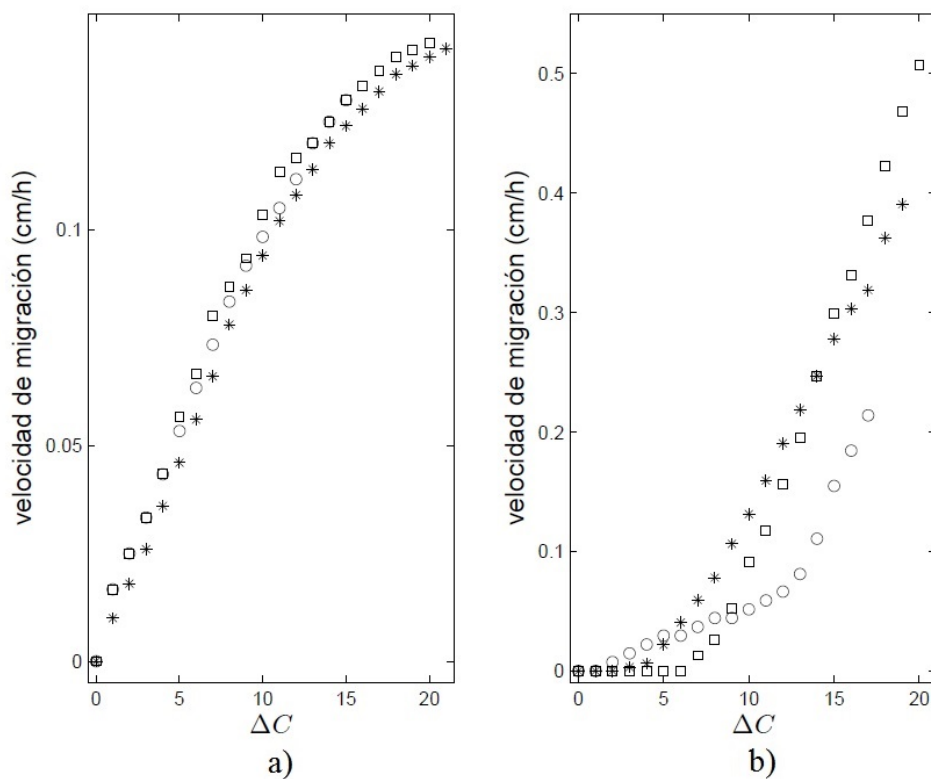


FIGURA 3.2: **Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros superenrollados:** a) Velocidad de migración durante la primera dimensión b) Velocidad de migración durante la segunda dimensión. Los (*) indican los geles corridos a 150 V en la 2da dimensión, los (□) los que se corrieron a 175 V y los (o), los que se corrieron a 200 V.

En ambas figuras se aprecia que las velocidades en primera dimensión se sitúan prácticamente sobre la misma línea. Este resultado era de esperarse ya que en esta dimensión todos los geles se corrieron bajo campos eléctricos de la misma intensidad y con la misma concentración de agarosa, siendo la única diferencia el tiempo de corrida, uno de los geles (el de 150 V) corrió 25 horas y los otros (el de 175 y 200 V), 30 horas.

En la figura 3.2b se observa el efecto del potencial eléctrico sobre la velocidad de migración de los dímeros superenrollados. Los primeros cinco topoisómeros migran relativamente igual bajo todos los voltajes, pero a

medida que aumenta el grado de superenrollamiento o ΔC , el avance electroforético de las moléculas forma una línea cuya pendiente es distinta para cada potencial aplicado. Si bien la pendiente de las moléculas que corrieron a 175 V es mayor que la pendiente de las moléculas corridas a 150 V; a 200 V se observa una disminución significativa del desplazamiento de los topoisómeros respecto a las OCs, lo que se traduce en una disminución drástica de la pendiente.

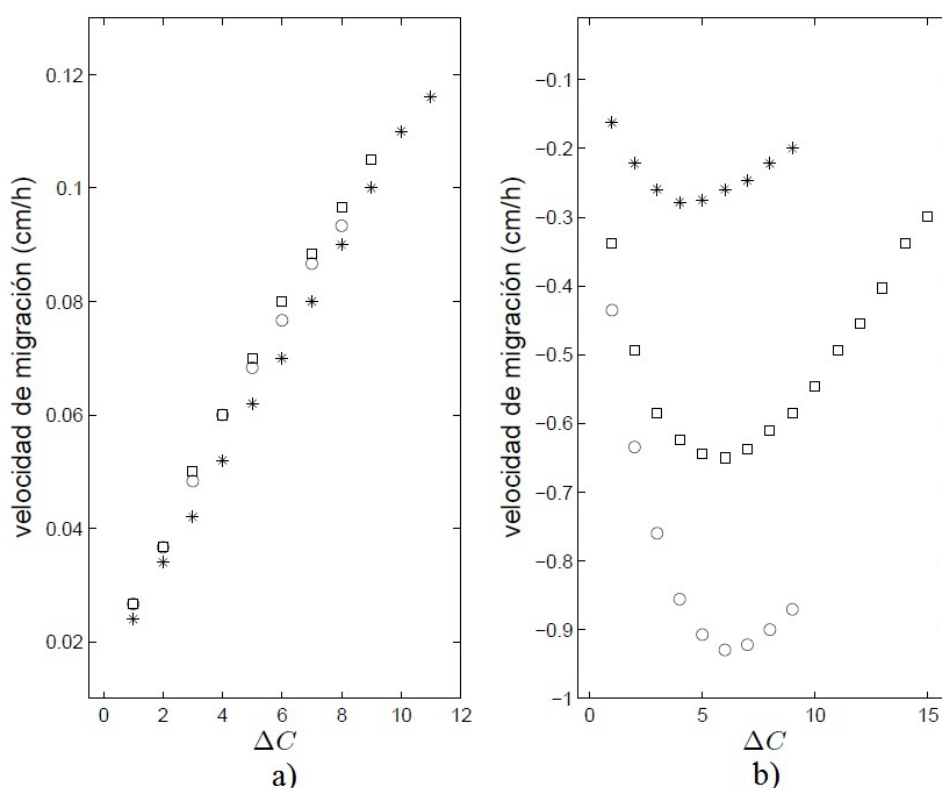


FIGURA 3.3: **Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros anudados.** a) Velocidad de migración durante la primera dimensión b) Velocidad de migración durante la segunda dimensión. Los (*) indican los geles corridos a 150 V en la 2da dimensión, los (□) los que corrieron a 175 y los (○), los que corrieron a 200 V.

La intensidad del campo eléctrico también influye en la migración en segunda dimensión de los dímeros anudados. En la figura 3.3b se observa que

los topoisómeros migran más y el arco que forman se hace más pronunciado a medida que aumenta el voltaje.

Los resultados obtenidos se utilizaron para validar el algoritmo propuesto por Kadomatsu *y col.* el cual propone el uso del esquema de diferencias finitas de Lax-Friedrich para resolver la ecuación de Maxwell-Stefan que simula el proceso de electroforesis bidimensional [49]. Los resultados de la simulación computacional bajo estas condiciones se muestran en las figuras 3.4 y 3.5.



FIGURA 3.4: **Simulación computacional de la primera dimensión de la electroforesis bidimensional en geles de agarosa:** Los círculos corresponden a la posición final de los topoisómeros de dímeros anudados y superenrollados en un gel de agarosa al 0.4%, corrido a 30 V. El tamaño de cada círculo es proporcional a la fracción molar del topoisómero que representa.

La figura 3.4 representa la simulación de la migración en primera dimensión de los topoisómeros de dímeros anudados y superenrollados. Durante la primera dimensión los topoisómeros se separan según el número de cruces, o el grado de complejidad y, por lo tanto, los que migran más son los topoisómeros con mayor ΔC , pero no se pueden distinguir los dímeros anudados de los superenrollados. Esto se resuelve durante la segunda dimensión de la electroforesis.

Los resultados de las simulaciones en la segunda dimensión bajo distintos potenciales eléctricos se aprecian en la figura 3.5. En esta figura se presentan las inmunodetecciones junto con las imágenes obtenidas por el programa computacional.

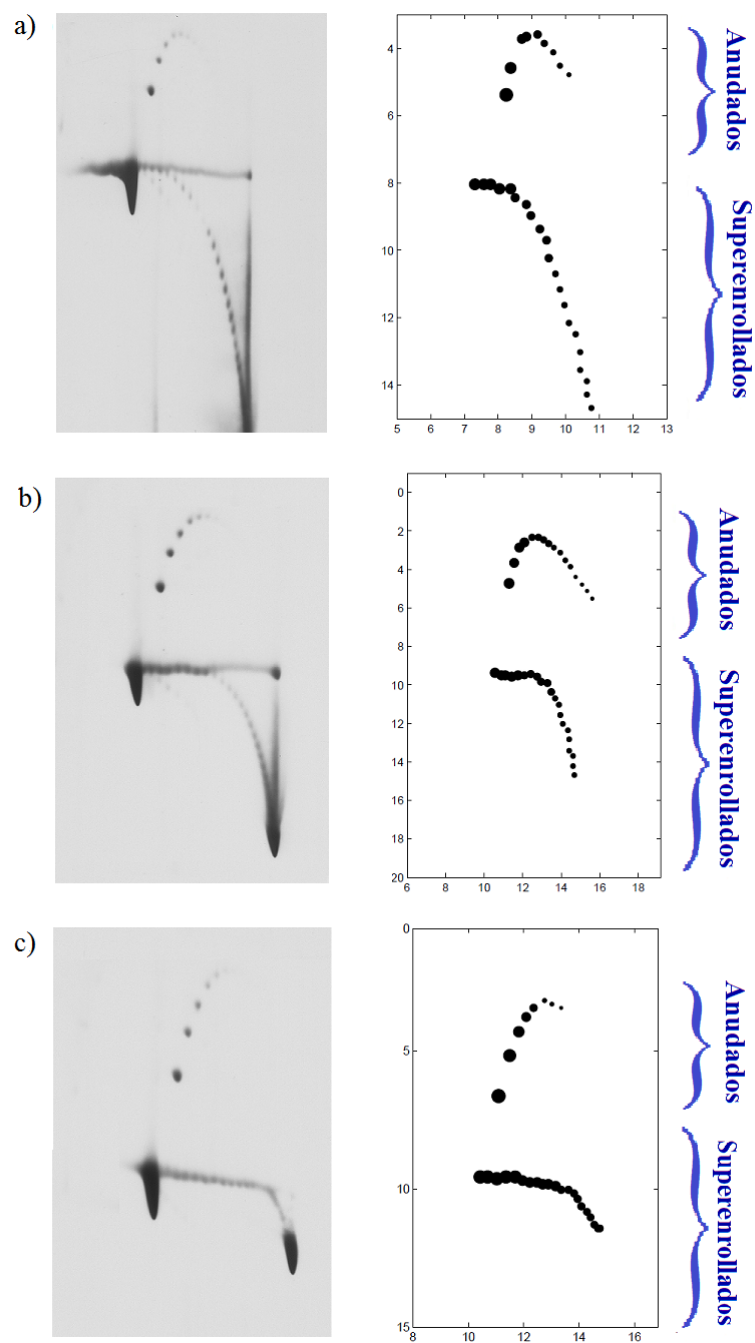


FIGURA 3.5: Simulación computacional de la movilidad electroforética a distintos voltajes durante la 2da dimensión: a) Inmunodetección y reproducción computacional correspondiente al gel corrido a 150V en la 2da dimensión; b) Inmunodetección y reproducción computacional correspondiente al gel corrido a 175 V; c) Inmunodetección y reproducción computacional correspondiente al gel corrido a 200 V.

Las comparaciones de los resultados de la simulación computacional con los datos experimentales se muestran en las figuras 3.6 y 3.7. En la figura 3.6 comparamos los resultados obtenidos de la simulación de la migración electroforética de los dímeros superenrollados cuando son sometidos a distintos potenciales eléctricos en la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional.

Debido a que todas las primeras dimensiones se realizaron bajo una única condición de concentración de agarosa y potencial eléctrico, en esta sección se presenta el gráfico comparativo de una sola simulación de esta dimensión, los valores de todas las simulaciones están en el Apéndice B. La máxima diferencia encontrada entre la migración simulada y la experimental corresponde a un 2,54% para el potencial de 150 V en la segunda dimensión, 2,16% para el potencial de 175 V y 1,02% para el potencial de 200 V tal como se muestra en la tabla 3.1.

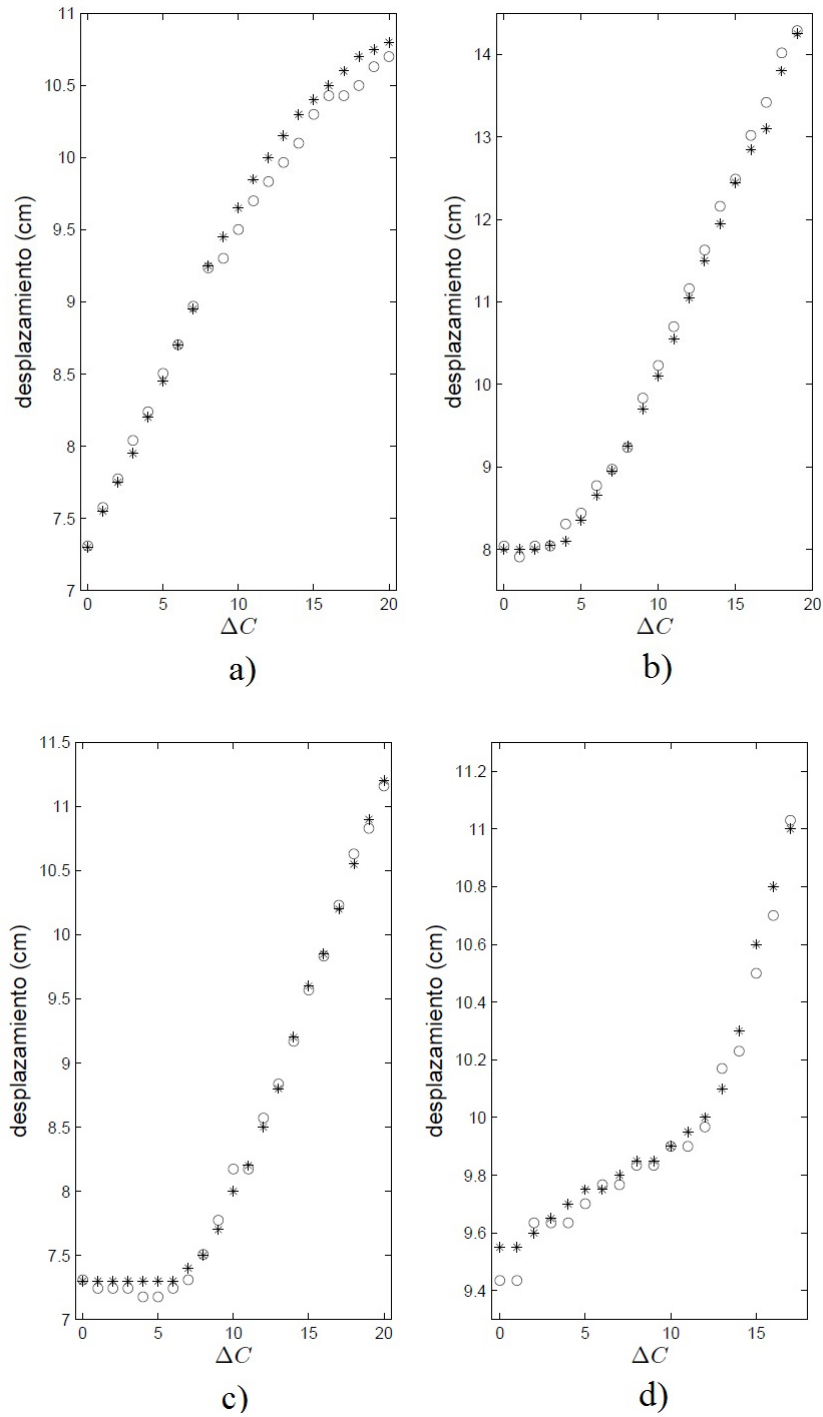


FIGURA 3.6: Comparación de los desplazamientos electroforéticos experimentales y las simulaciones computacionales de los dímeros superenrollados: a) Desplazamiento en 1ra dimensión b) Desplazamiento en 2da dimensión a 150 V c) Desplazamiento en 2da dimensión a 175 V, y d) Desplazamiento en 2da dimensión a 200 V. Los (*) indican los resultados de la electroforesis y los (o) corresponden a los resultados de la simulación numérica.

TABLA 3.1: Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético de dímeros superenrollados con la simulación en condiciones de potencial eléctrico variable.

ΔC	Potencial Eléctrico					
	150 V		175 V		200 V	
	1º Dim.	2da Dim.	1ra Dim.	2da Dim.	1ra Dim.	2da Dim.
0	0,12	0,500	1,26	0,123	1,26	0,188
1	0,33	1,163	0,37	0,781	0,37	0,503
2	0,31	0,500	0,45	0,781	0,18	0,333
3	1,13	0,124	1,15	0,781	0,53	0,528
4	0,48	2,543	1,38	1,699	0,26	0,010
5	0,65	1,066	0,75	1,699	0,50	0,174
6	0,05	1,399	1,06	0,781	0,25	0,862
7	0,22	0,223	0,47	1,230	0,56	1,020
8	0,15	0,151	0,47	0,107	0,86	0,843
9	1,57	1,381	0,46	0,961	0,69	0,162
10	1,53	1,287	0,67	2,163	0,68	0,000
11	1,51	1,422	0,07	0,329	0,22	0,171
12	1,66	0,995	0,36	0,835	0,29	0,300
13	1,80	1,130	0,36	0,420	0,58	0,693
14	1,94	1,757	0,28	0,337	0,21	0,680
15	0,96	0,321	0,14	0,333	0,14	0,943
16	0,67	1,323	0,84	0,162		0,278
17	1,60	2,443	0,14	0,294		0,909
18	1,87	1,594	0,07	0,758		
19	1,12	0,281	0,48	0,642		
20	0,37		0,55	0,357		

Las comparaciones de los resultados obtenidos con la simulación de la migración electroforética de dímeros anudados sometidos a distintos potenciales eléctricos se muestran en la figura 3.7, en la misma se muestra solamente el gráfico comparativo de un sola simulación de la primera dimensión.

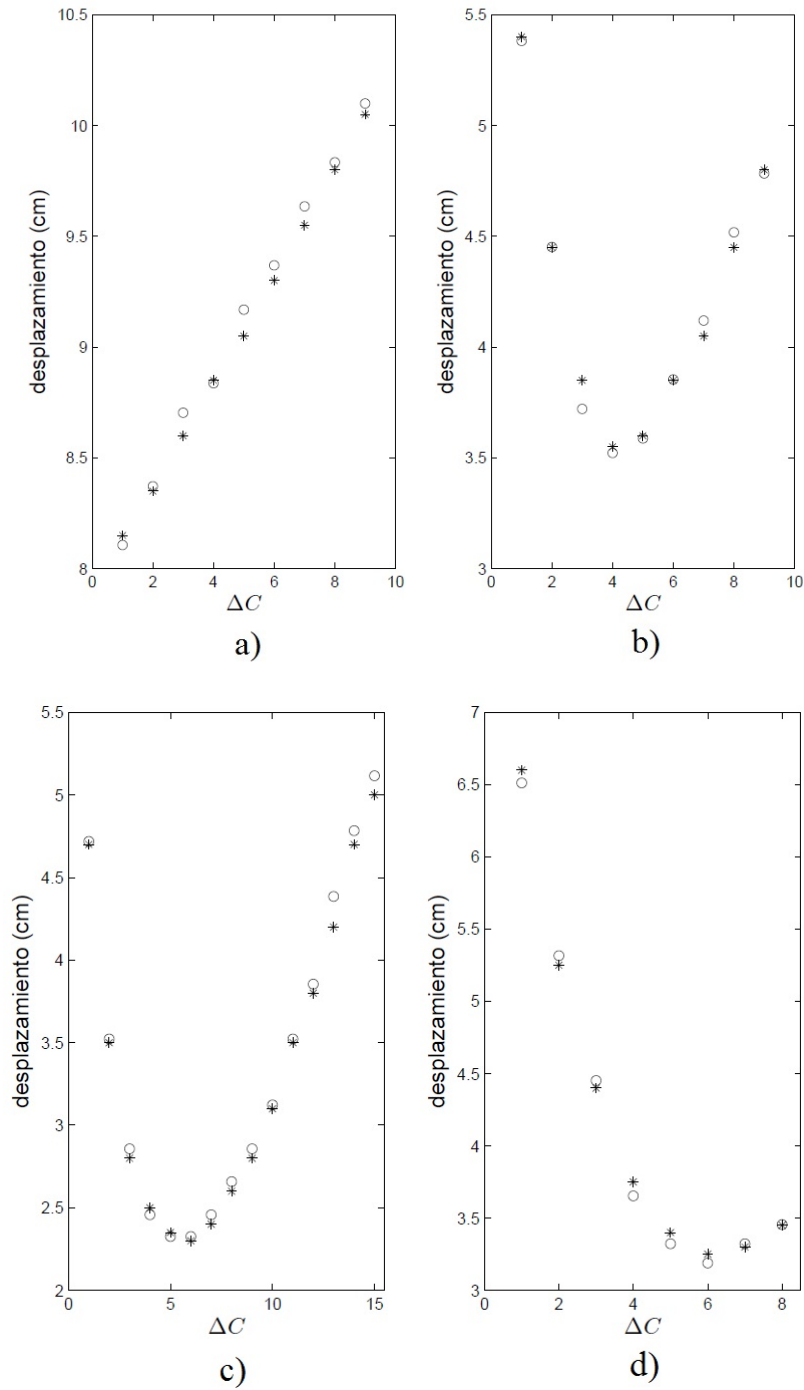


FIGURA 3.7: Comparación de los desplazamientos electroforéticos experimentales y las simulaciones computacionales de los dímeros anudados: a) Desplazamiento en 1ra dimensión b) Desplazamiento en 2da dimensión a 150 V c) Desplazamiento en 2da dimensión a 175 V, y d) Desplazamiento en 2da dimensión a 200 V. Los (*) indican los resultados de la electroforesis y los (o) corresponden a los resultados de la simulación numérica.

La máxima diferencia encontrada entre la migración calculada y la experimental corresponde a un 2,167 % cuando el potencial aplicado en la segunda dimensión es de 150 V, 4,31% para el potencial de 175 V y 2,10% para el potencial de 200 V tal como se muestra en la tabla 3.2.

TABLA 3.2: Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético de dímeros anudados con la simulación numérica en condiciones de potencial eléctrico variable.

ΔC	Potencial Eléctrico					
	150 V		175 V		200 V	
	1ra Dim.	2da Dim.	1ra Dim.	2da Dim.	1ra Dim.	2da Dim.
1	0,000	1,556	1,171	0,334	0,000	0,000
2	0,448	0,045	0,877	0,334	0,351	0,568
3	0,088	0,104	0,339	2,453	0,511	0,246
4	0,345	1,070	0,579	0,345	0,083	0,318
5	0,338	2,167	0,242	4,309	0,081	0,541
6	0,166	1,636	0,079	0,334	1,270	1,647
7	0,488	0,074	0,077	1,440	0,930	1,257
8	0,478	0,045	0,152	1,351	1,985	2,105
9	0,703	1,708	0,535	0,625		1,238
10	0,230			1,401		

3.2 Efecto de la concentración de agarosa sobre la movilidad electroforética de dímeros anudados y superenrollados

Con el objeto de comparar el rol de la concentración de agarosa en la movilidad electroforética de los dímeros superenrollados y de los anudados, se realizaron geles bidimensionales donde se mantuvo constante el potencial eléctrico en 150 V y se varió la concentración de agarosa en la segunda dimensión. Los resultados se resumen en las inmunodetecciones de la figura

3.8. En las mismas se aprecian dos arcos de señales, el arco superior corresponde a los dímeros anudados y el arco inferior a los dímeros superenrollados. Se observa además la señal correspondiente a las OCs, esta es la señal correspondiente al primer topoisómero del arco inferior.

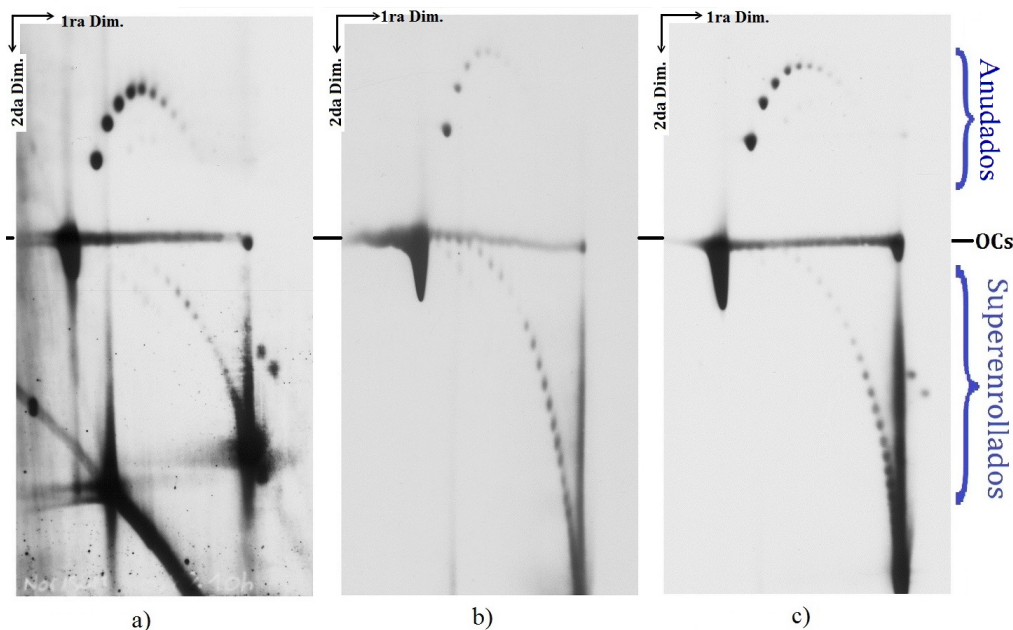


FIGURA 3.8: **Electroforesis bidimensional con distintas concentraciones de agarosa en la 2da dimensión:** La primera dimensión se realizó en geles de agarosa al 0.4% y se corrió a 30 V. Las segundas dimensiones se llevaron a cabo a 150 V, en geles de agarosa al a) 0.8%, b) 1.0% y c) 1.2%.

Debido a que la concentración de la agarosa afecta la velocidad de migración de las moléculas, el tiempo de corrida para cada concentración fue diferente, el gel de agarosa al 0,8% se corrió durante 10 horas, el gel de agarosa al 1,0% corrió durante 16 horas y el gel al 1,2% se corrió durante 22 horas. Estos tiempos se determinaron observando la migración del plásmido pBR322, utilizado como marcador. De nuevo, se tuvo que normalizar la migración de los topoisómeros de cada familia respecto a las OCs, tanto en la primera como en la segunda dimensión. La figuras 3.10 y 3.9 muestran estas velocidades en función al ΔC .

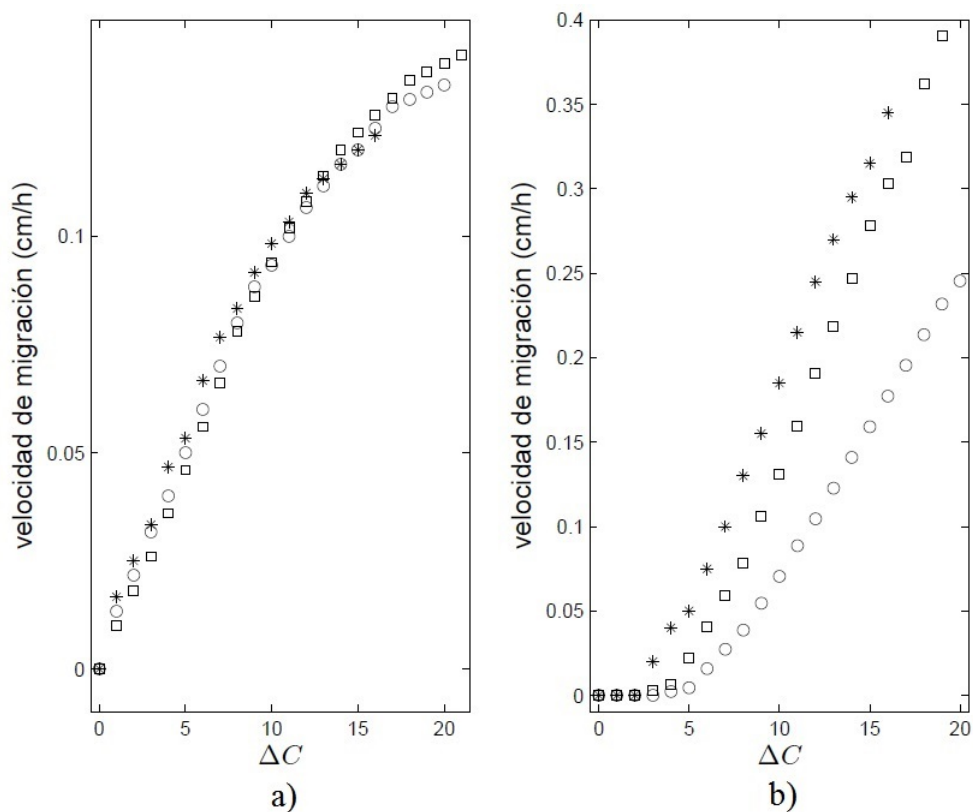


FIGURA 3.9: **Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros superenrollados respecto a las OCs:** a) Velocidad de migración durante la primera dimensión b) Velocidad de migración durante la segunda dimensión. Los (*) indican los topoisómeros corridos en geles de agarosa al 0,8% en la 2da dimensión, los (□) los que se corrieron en geles de agarosa al 1,0% y los (o), los que se corrieron en geles de agarosa al 1,2%.

En la figura 3.9 se muestra la velocidad de migración de los dímeros superenrollados respecto a la señal de las OCs. Se observa que las velocidades de migración en primera dimensión se sitúan sobre la misma línea (figura 3.9a), mientras que en la segunda dimensión se observa que los primeros cuatro topoisómeros migran relativamente igual para todas las concentraciones de agarosa y a partir del quinto topoisómero las moléculas aumentan su movilidad y forman una recta cuya pendiente disminuye a medida que aumenta la concentración de agarosa (figura 3.9b).

En la figura 3.10 se muestra la velocidad de migración de los dímeros anudados respecto a la señal de las OCs.

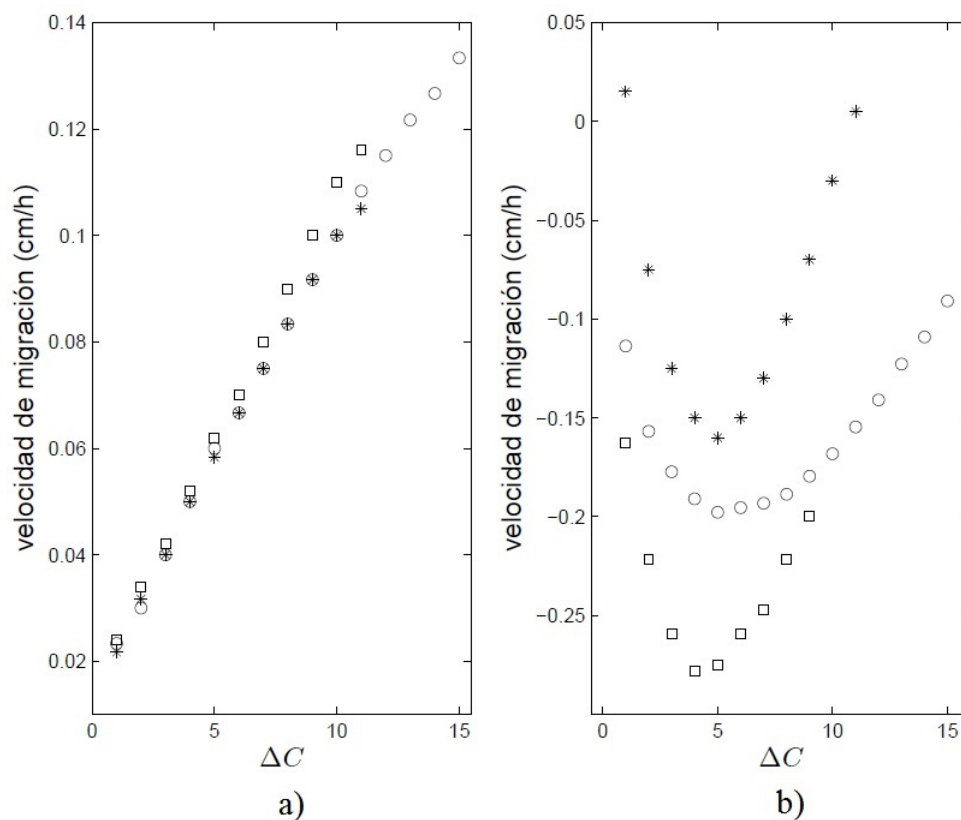


FIGURA 3.10: **Velocidad de migración de los topoisómeros de los dímeros anudados respecto a las OCs:** a) Velocidad de migración durante la primera dimensión b) Velocidad de migración durante la segunda dimensión. Los (*) indican los topoisómeros corridos en geles de agarosa al 0,8% en la 2da dimensión, los (□) los que se corrieron en geles de agarosa al 1,0% y los (o), los que se corrieron en geles de agarosa al 1,2%.

De nuevo se pudo constatar que las velocidades de migración en primera dimensión se sitúan sobre la misma línea (figura 3.10a). En la figura 3.10b se observa que en la segunda dimensión, si bien se produce un cambio en la distancia de separación de los topoisómeros respecto al eje horizontal, la forma de la curva correspondiente al desplazamiento de los topoisómeros en función al ΔC no varía significativamente con la concentración de agarosa.

Con el fin de simular el proceso de electroforesis bidimensional a diferentes concentraciones de agarosa, se empleó el algoritmo propuesto por Kado-matsu *y col.* [49]. Los resultados de las simulaciones de la segunda dimensión a distintas concentraciones de agarosa se aprecian en la figura 3.11. En la misma se presentan las inmunodetecciones junto con las imágenes obtenidas por el programa computacional.

Las comparaciones de los resultados obtenidos de la simulación de la computacional y los datos experimentales de las electroforesis bidimensionales bajo distintas concentraciones de agarosa se muestran en las figuras 3.12 y 3.13 y en las tablas 3.3 y 3.4.

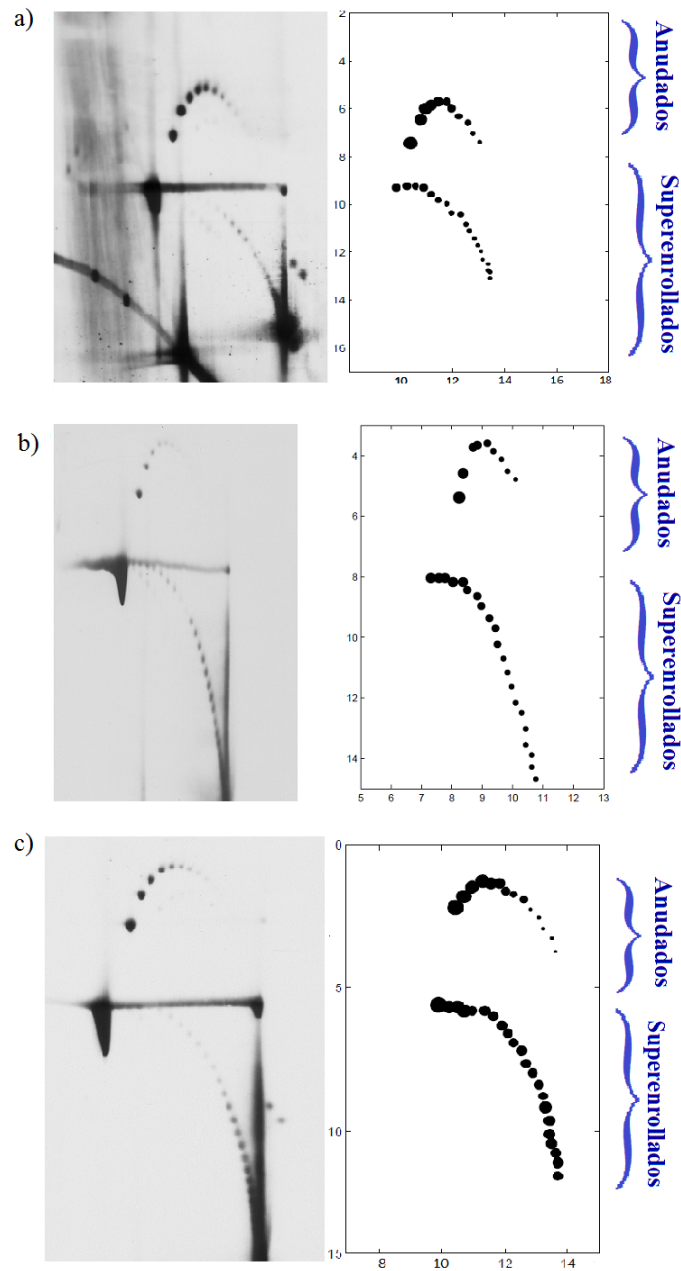


FIGURA 3.11: Simulación computacional de la movilidad electroforética con distintas concentraciones de agarosa: a) Inmunodetección y reproducción computacional correspondiente al gel de agarosa al 0,8% en la 2da dimensión; b) Inmunodetección y reproducción computacional correspondiente al gel de agarosa al 1,0%. c) Inmunodetección y reproducción computacional correspondiente al gel de agarosa al 1,2%.

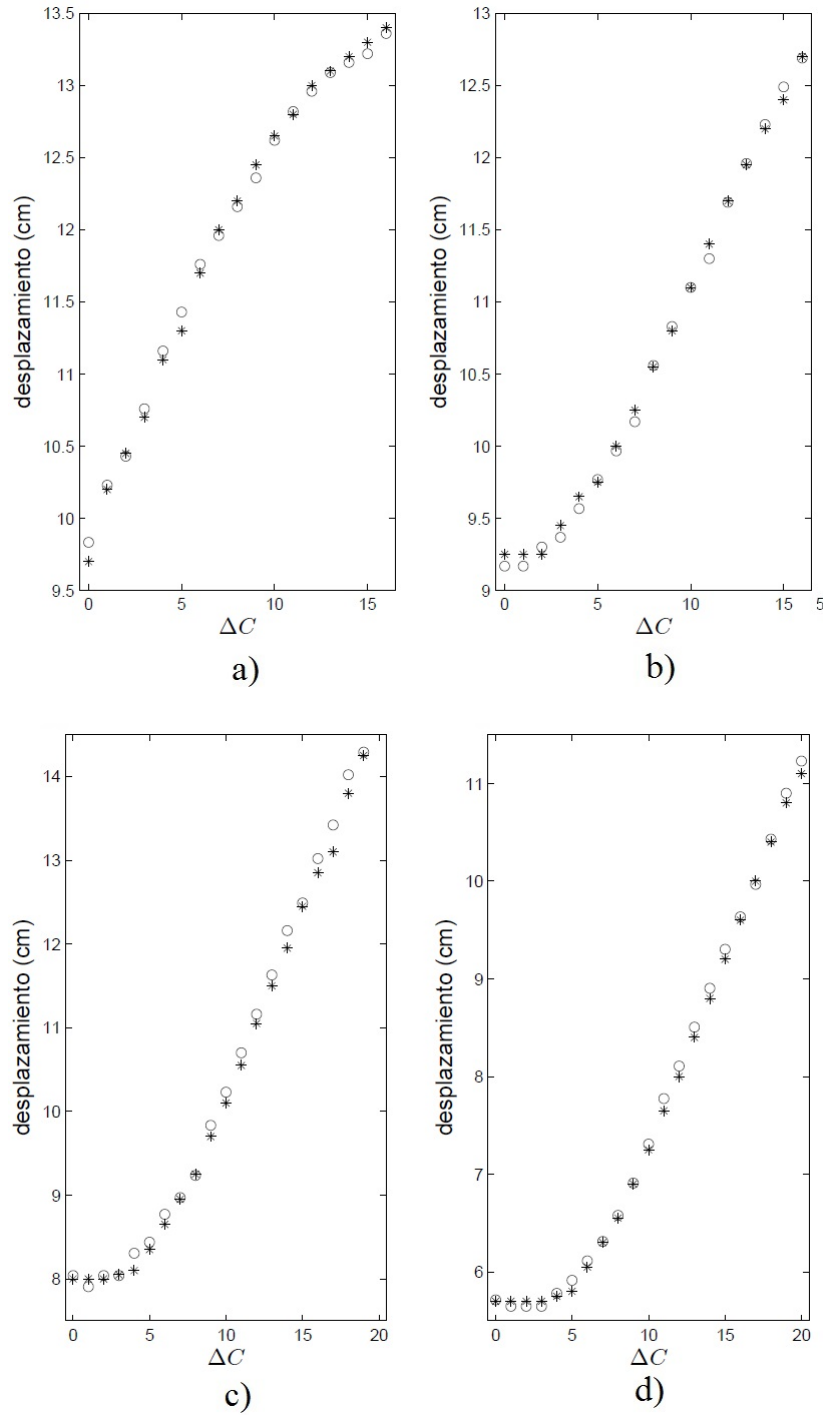


FIGURA 3.12: Comparación de los desplazamientos electroforéticos experimentales y las simulaciones computacionales de los dímeros superenrollados: a) Desplazamiento en la 1ra dimensión b) Desplazamiento en la 2da dimensión con agarosa al 0,8 % c) Desplazamiento en la 2da dimensión con agarosa al 1,0%. d) Desplazamiento en la 2da dimensión con agarosa al 1,2 %. Los (*) indican los resultados de la electroforesis y los (o) corresponden a los resultados de la simulación numérica.

La simulación computacional del proceso electroforético bajo distintas concentraciones de agarosa en la segunda dimensión fue menos preciso, siendo el error porcentual máximo igual a 2,54 %, correspondiente a los dímeros superenrollados corridos en geles de agarosa al 1,97% durante la segunda dimensión, tal como se muestra en la tabla 3.3.

TABLA 3.3: Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético experimental de dímeros superenrollados con la simulación numérica bajo distintas concentraciones de agarosa.

ΔC	Concentración de agarosa					
	0,8 %		1,00%		1,2 %	
	1ra Dim	2da Dim	1ra Dim	2da Dim	1ra Dim	2da Dim
0	1,381	0,876	0,123	0,500	1,381	0,246
1	0,294	0,876	0,331	1,163	0,693	0,912
2	0,191	0,562	0,310	0,500	0,773	0,912
3	0,561	0,857	1,132	0,124	1,033	0,912
4	0,541	0,850	0,476	2,543	1,193	0,539
5	1,150	0,195	0,651	1,066	0,893	1,966
6	0,513	0,330	0,046	1,399	0,522	1,041
7	0,333	0,780	0,223	0,223	0,254	0,190
8	0,328	0,095	0,151	0,151	0,579	0,427
9	0,723	0,278	1,566	1,381	0,972	0,145
10	0,237	0,000	1,534	1,287	0,080	0,814
11	0,156	0,877	1,513	1,422	0,630	1,621
12	0,308	0,085	1,660	0,995	0,620	1,325
13	0,076	0,084	1,803	1,130	0,230	1,250
14	0,303	0,246	1,942	1,757	0,303	1,182
15	0,602	0,726	0,962	0,321	0,602	1,109
16	0,299	0,472	0,667	1,323	0,669	0,365
17			1,604	2,443	0,809	0,330
18			1,869	1,594	0,733	0,288
19			1,116	0,281	0,584	0,926
20			0,370		0,000	1,171

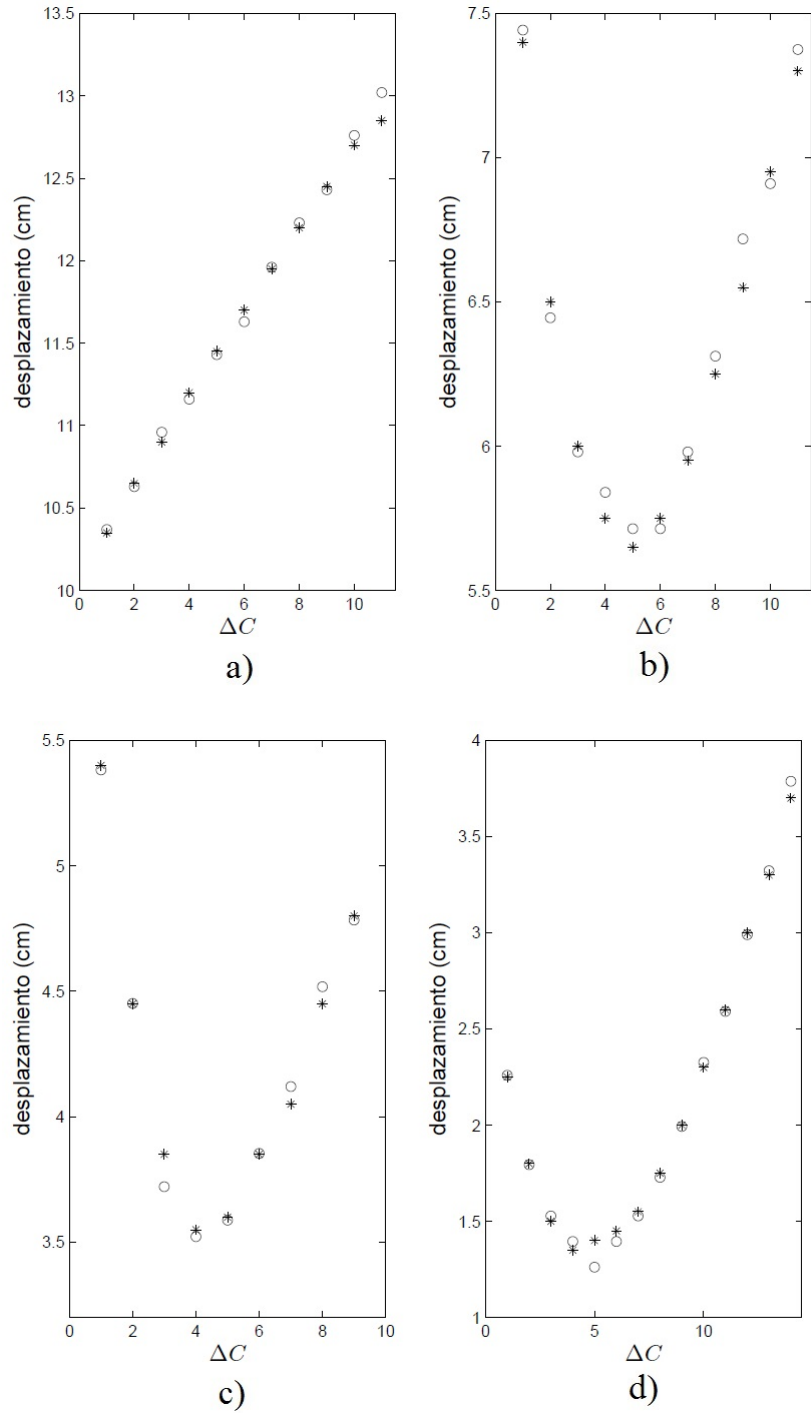


FIGURA 3.13: Comparación de los resultados experimentales con las simulaciones computacionales de la electroforesis bidimensional de dímeros anudados: a) Desplazamiento en la 1ra dimensión b) Desplazamiento en la 2da dimensión con agarosa al 0,8 % c) Desplazamiento en la 2da dimensión con agarosa al 1,0%. d) Desplazamiento en la 2da dimensión con agarosa al 1,2 %. Los (*) indican los resultados de la electroforesis y los (o) corresponden a los resultados de la simulación numérica.

La máxima diferencia encontrada entre la migración calculada y la experimental corresponde a un 2,56 % cuando la concentración de agarosa utilizada en la segunda dimensión es de 0,8%. El máximo error porcentual correspondiente a los dímeros anudados corridos en geles de agarosa al 1,0% fue de 2,17 % y el error porcentual correspondientes a los geles corridos en agarosa al 1,2% fue de 9,90%.

TABLA 3.4: Errores porcentuales obtenidos al comparar el avance electroforético experimental de dímeros anudados con la simulación numérica bajo distintas concentraciones de agarosa.

ΔC	Concentración de agarosa					
	0,8 %		1,00%		1,2 %	
	1ra Dim	2da Dim	1ra Dim	2da Dim	1ra Dim	2da Dim
0						
1	0,193	0,568	0,000	1,556	0,288	9,900
2	0,188	1,200	0,448	0,045	0,283	0,400
3	0,550	0,333	0,088	0,104	0,000	0,333
4	0,357	0,626	0,345	1,070	0,893	1,867
5	0,175	1,133	0,338	2,167	0,000	3,333
6	0,598	1,687	0,166	1,636	0,513	9,857
7	0,084	0,504	0,488	0,074	0,084	3,793
8	0,492	0,992	0,478	0,045	0,246	1,419
9	0,161	2,565	0,703	1,708	0,884	1,257
10	0,472	0,576	0,230		0,472	0,350
11	1,323	1,027			0,541	1,130
12					0,076	0,346
13					0,524	0,333
14					0,370	0,667
15					7,372	2,351

Capítulo 4

Discusión

En la presente tesis se han empleado las ecuaciones de Maxwell-Stefan, aplicando el esquema de Lax-Friedrich para diferencias finitas, con el fin de simular la movilidad electroforética de dímeros anudados y superenrollados de igual masa molecular. Los resultados de las electroforesis bidimensionales en geles de agarosa y las simulaciones computacionales han demostrado que bajo las condiciones de la primera dimensión, es decir a baja concentración de agarosa y bajo voltaje, los topoisómeros de ambas familias se separan linealmente según el número de cruces, en orden creciente. Estudios previos de electroforesis unidimensionales en moléculas de ADN anudadas y encadenadas demostraron que a bajo voltaje la movilidad electroforética de topoisómeros de igual masa molecular está en relación prácticamente lineal con el número promedio de cruces [37, 10, 19]. La explicación propuesta nos dice que a medida que las moléculas van haciéndose más complejas, ya sea por el grado de superenrollamiento o anudamiento, éstas se vuelven más compactas y esta compactación permite que las moléculas puedan moverse mejor en el entramado del gel de agarosa. Nuestros resultados de electroforesis bidimensional y simulación computacional en condiciones de

bajo voltaje y baja concentración de agarosa (1ra dimensión) concuerdan con estas afirmaciones, tanto para los dímeros superenrollados como para los dímeros anudados. Sin embargo, al llevar a cabo la segunda dimensión de la electroforesis, con mayor concentración de agarosa en el gel y a mayor voltaje, nuestros resultados muestran que la relación casi lineal entre el número de cruces (ΔC) y la movilidad de las moléculas no se mantiene. Es más, los dímeros anudados y los dímeros superenrollados, a pesar de ser moléculas del mismo tamaño, misma masa, misma carga eléctrica e igual secuencia de nucleótidos, migran de manera muy diferente en estas condiciones. En las figuras 3.1 y 3.8 se observa que los dímeros anudados forman un arco similar a una parábola por encima de las señales correspondientes a los dímeros superenrollados, lo que indica que los dímeros superenrollados migran mucho más que los dímeros anudados. Debido a que todas las moléculas analizadas presentan la misma masa y composición química, podemos deducir que esta diferencia de movilidad estaría relacionada con variables sensibles a la forma topológica, como el grado de compactación y la capacidad de deformarse, o deformabilidad. En las condiciones de la 2da dimensión, las moléculas están forzadas a avanzar velozmente a través de los poros del gel y la única alternativa para los topoisómeros es deformarse para reducir el área perpendicular al sentido del avance. Como consecuencia, los nudos migran menos que los superenrollados con igual número de cruces, posiblemente por tener menos capacidad de deformación.

Al analizar la migración de los topoisómeros correspondientes a cada familia se observa que, en el caso de los dímeros superenrollados, los topoisómeros con menor grado de superenrollamiento, o ΔC , migran más lentamente que los topoisómeros con mayor grado de superenrollamiento. Sin embargo, esta relación no es lineal. Los topoisómeros con menor ΔC ganan movilidad muy lentamente hasta que llegan a un nivel de superenrollamiento a partir

del cual el aumento de la movilidad es más brusco. Esta diferencia en el desplazamiento se hace más pronunciada a medida que el campo eléctrico aplicado es mayor. A un potencial eléctrico de 150 V se observa que la velocidad de los topoisómeros más simples es prácticamente constante antes de llegar al punto donde se produce un aumento brusco de velocidad. A 200 V, ocurre prácticamente lo mismo, la velocidad de los topoisómeros más simples aumenta muy levemente, hasta que eventualmente se llega a un punto donde la velocidad de migración es directamente proporcional al grado de superenrollamiento de la molécula. La cantidad de topoisómeros con velocidad de migración casi constante es mayor a medida que aumenta la intensidad del campo eléctrico.

En el caso de las moléculas anudadas, los resultados presentados en este trabajo muestran un patrón de migración diferente al de las moléculas superenrolladas. Inicialmente los topoisómeros correspondientes a los nudos más simples disminuyen de velocidad a medida que aumenta la complejidad de los nudos (ΔC), pero a partir de cierto punto, que denominamos punto de inflexión, los topoisómeros ganan movilidad a medida que aumenta el número de cruces. En un trabajo de electroforesis bidimensional en geles de agarosa de intermediarios de replicación anudados realizado por Sogo *y col.*, se observó que en la primera dimensión la movilidad de los topoisómeros es directamente proporcional al número de cruces, ΔC , mientras que en segunda dimensión, la movilidad de los topoisómeros es inversamente proporcional al ΔC [38]. Este resultado fue analizado por Weber *y col.* quienes sugirieron que, en las condiciones de segunda dimensión (alta concentración de agarosa y elevado potencial eléctrico) las moléculas se mueven más rápido y esto hace más notable el efecto del entramado del gel como un obstáculo para el avance de las mismas. A partir de dicho trabajo se concluyó que a medida que los nudos son más complejos, disminuye su

capacidad de deformación y, por lo tanto, las moléculas tardan más en reacomodarse para pasar por los poros, lo que se traduce en una disminución en la velocidad de migración al aumentar el ΔC . Sin embargo, en estos trabajos no se observa el patrón de migración bimodal obtenido en las inmunodetecciones de esta tesis. En un estudio llevado a cabo por Arsuaga y *col.*, se realizó una electroforesis bidimensional de moléculas anudadas extraídas del bacteriófago P4, y se observó un patrón de migración muy similar al obtenido en esta tesis. Una hipótesis que explica este comportamiento es suponer que en las condiciones de alto voltaje y alta concentración de agarosa de la segunda dimensión, la movilidad de las moléculas anudadas depende tanto de la deformabilidad como de la compactación. Las moléculas con bajos valores de ΔC presentan menor compactación y la capacidad para atravesar los poros del gel depende de su deformabilidad. Los topoisómeros menos deformables necesitan más tiempo para alcanzar la configuración que les permita atravesar el entramado del gel de agarosa. A medida que aumenta el ΔC , las moléculas van perdiendo su capacidad de deformación, por lo que migran más lentamente. Llegado cierto punto, los topoisómeros llegan a ser lo suficientemente compactos como para pasar por los poros con menos dificultad. En este trabajo se observó que este "punto de inflexión" depende del voltaje aplicado en la segunda dimensión. Cuando el voltaje aplicado fue de 150 V el punto de inflexión se encontró en el quinto topoisómero, mientras que para 175 y 200 V, se localizó en el sexto topoisómero. En los trabajos de Kadomatsu y de Cebrián y *col.* se observa que las moléculas anudadas presentan un patrón de migración muy similar al de las moléculas encadenadas con superenrollamiento nulo, denominadas CatAs [49, 16]. En ambos casos, los topoisómeros más simples inicialmente disminuyen su movilidad al aumentar su ΔC hasta llegar al punto de inflexión, a partir del cual la velocidad de migración aumenta junto con el ΔC .

Observando la figura A.1 del Apéndice A se puede notar que los nudos y los encadenados de tipo CatAs presentan topologías muy similares, lo que nos señala la influencia de la forma topológica de las moléculas en su movilidad durante la segunda dimensión de la electroforesis en geles de agarosa. Si bien los CatAs alcanzan su punto de inflexión antes que los plásmidos anudados, en ambas familias topológicas la posición de este punto varía según el potencial eléctrico aplicado en la segunda dimensión.

Al analizar el efecto de la concentración de la agarosa en la migración de las moléculas en la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional, se observó que, si bien las moléculas de dímeros anudados y dímeros superenrollados pierden movilidad al aumentar la concentración de agarosa del gel, mantienen su perfil de migración, es decir que la formas de las curvas no cambian. Estos resultados nos sugieren que la variable que más influye en la migración de las moléculas durante la electroforesis es el potencial eléctrico. Queda pendiente ampliar el rango del potencial eléctrico a ser utilizado en la segunda dimensión y, específicamente, estudiar la movilidad electroforética en condiciones de alta concentración de agarosa y bajo voltaje durante la segunda dimensión.

La comparación de la electroforesis bidimensional y la simulación computacional ha demostrado que es factible simular el proceso de electroforesis bidimensional en geles de agarosa resolviendo las ecuaciones de Maxwell-Stefan. Con esta técnica se ha logrado reproducir con bastante precisión y exactitud la movilidad electroforética de los dímeros anudados y los superenrollados ya que el margen de error está dentro de la incertidumbre propia del experimento. En ese sentido la implementación de la simulación computacional en el estudio de la movilidad electroforética podría ser de gran utilidad en la interpretación de las señales observadas en la electroforesis

de bidimensional. Como trabajo pendiente queda el análisis de la movilidad electroforética de moléculas de ADN con distintas regiones topológicas como lo son los intermediarios de replicación (RIs), y de moléculas que además de estar encadenadas unas con otras, también presentan varios grados de superenrollamiento (CatBs y CatCs). Para tal fin, será necesario realizar modelos computacionales que cuantifiquen la relación entre deformabilidad de las moléculas con el número de cruces, y la relación entre la compactación con el número de cruces. Queda también como trabajo futuro incluir en el estudio de movilidad electroforética, la masa de las moléculas. Para tal fin, se realizarán electroforesis bidimensionales en geles de agarosa con plásmidos de distintos tamaños.

El radio hidrodinámico es una medida de la movilidad de una sustancia a través de un soluto tomando en cuenta la interacción con las moléculas del solvente. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la electroforesis bidimensional en geles de agarosa de moléculas de igual tamaño pero distinta forma topológica, sería importante poder incluir en el modelo matemático la relación entre el radio hidrodinámico y la topología de las moléculas.

Capítulo 5

Conclusiones

- Las ecuaciones de Maxwell-Stefan son capaces de reproducir con precisión la electroforesis bidimensional en geles de agarosa de los dímeros anudados y superenrollados bajo distintas condiciones de concentración de agarosa y potencial electrostático.
- La velocidad de migración electroforética de los dímeros superenrollados es mayor que la velocidad de migración electroforética de los dímeros anudados durante la segunda dimensión.
- El potencial electrostático aplicado durante la segunda dimensión afecta notablemente la movilidad electroforética de los topoisómeros de los dímeros anudados y los dímeros superenrollados, modificando tanto la forma de las curvas correspondientes a cada familia como la separación entre los topoisómeros de cada una de ellas.
- La concentración de agarosa afecta levemente el patrón de movilidad electroforética de los topoisómeros de los dímeros anudados y los dímeros superenrollados. Si bien los topoisómeros de cada familia se mueven más lentamente a medida que aumenta la concentración de

agarosa, las curvas conformadas por los dímeros superenrollados y los dímeros anudados cambian levemente, lo que implica que la separación entre los topoisómeros se mantiene casi constante con la variación de la concentración de la agarosa.

- La deformabilidad y la compactación de las moléculas de ADN son los principales factores que determinan la movilidad electroforética de los dímeros anudados y superenrollados en la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

Referencias Bibliográficas

- [1] Bates, A.D., and Maxwell, A.D. *DNA Topology*. Oxford University Press, second edition, 2005.
- [2] Adams, C.C. *The Knot Book: An elementary introduction to the mathematical theory of knots*. W. H. Freeman and Company, second edition, 2004.
- [3] Murasugi, K. *Knot Theory and Its Applications*. Birkhäuser, First, translated from Japanese edition, 1996.
- [4] Huang, J-Y., and Lai, P-Y. Crossings and writhe of flexible and ideal knots. *Phys. Rev.*, E 63:021506–6, 2001.
- [5] Rolfsen, D. *Knots and Links*. American Mathematical Society, second edition, 2003.
- [6] Alexander, J.W., and Briggs, G.B. On types of knotted curves. *Ann. of Math.*, 28:562–586, 1927.
- [7] Brasher, R., Scharein, R.G., and Vazquez, M. New biologically motivated knot table. *Biochemical Society Transactions*, 41:606–611, 2013.
- [8] Klenin, K., and Langowski, J. Computation of writhe in modeling of supercoiled DNA. *Biopolymers*, 54:307–317, 2000.

-
- [9] Katrich, V., Bednar, J., Michoud, D., Scharein, R.G., Dubochet, J., and Stasiak, A. Geometry and physics of knots. *Nature*, 384:142–145, 1996.
- [10] Stasiak, A., Katrich, V. Bednar J., Michoud, D., and Dubochet, J. Electrophoretic mobility of DNA knots. *Nature*, 384:122, 1996.
- [11] Lobanov, M.Y., Bogatyreva, N. S., and Galzitskaya, O. V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*, 42(4):623–628, 2008.
- [12] Teraoka, I. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*. John Wiley & Sons Inc., first edition, 2002.
- [13] Espeli, O. and Boccard, F. Organization of the E.coli chromosome into macrodomains and its possible functional implications. *J. Struct. Biol.*, 156:304–310, 2006.
- [14] Peter, B.J., Arsuaga, J., Breier, A.M., Khodursky, A.B., Brown, P.O. and Cozzarelli, N.R. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in Escherichia coli. *Genome Biol.*, 5:R87, 2004.
- [15] Robles, M.L., Witz, G., Hernández, P., Schvarztman, J. B., Stasiak, A., and Krimer, B.D. Interplay of DNA supercoiling and catenation during segregaion of sister duplexes. *Nucleic Acid Research*, 39:5126–5137, 2009.
- [16] Cebrián, Kadomatsu-Hermosa, Castán, Martínez, Parra, Fernández-Nestosa, Schaerer, Martínez-Robles, Hernández, Krimer, Stasiak, and Schvartzman. Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules. *Nucleic Acid Research*, 2014.

-
- [17] Schwartzman, J.B., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P. and Krimer, D.B. Plasmid DNA replication and topology as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Plasmid*, 63:1–10, 2010.
- [18] Liu, L.F., Perkocha, L., Calendar, R., and Wang, J.C. Knotted DNA from bacteriophage capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79(8):5498–5502, 1981.
- [19] Dean, F.B., Stasiak, A., Koller, T. and Cozzarelli, N.R. Duplex DNA knots produced by escherichia coli topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(8):4975–4983, 1985.
- [20] Wang, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev.*, 3:430–440, 2002.
- [21] Nittis, J.L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Rev. Cancer*, 9:327–337, 2009.
- [22] Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M.H. and Nash, H.A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73(3):872–887, 1976.
- [23] Wang, J.C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 54:665–697, 1985.
- [24] López, V., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 40(8):3563–3573, 2012.
- [25] Arsuaga J., M. Vazquez, McGuirk, P., Trigueros, S., Sumners, D.W., and J. Roca. DNA knots reveal a chiral organization of DNA in phage capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(26):9165–9169, 2005.

-
- [26] Vinograd, J., Lebowitz, R., Radloff, R., Watson, R. and Laipis, P. The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 53:1104–1111, 1965.
- [27] Lynn, E.Z., and Crisona, N.J. Coating DNA with RecA protein to distinguish DNA path by electron microscopy. *DNA Topoisomerase Protocols*, 94:99–107, 1997.
- [28] Westermeier, R. *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*. Wiley-VCH, second edition, 2005.
- [29] Laurie, B., Katritch, V., Sogo, J., Koller, T., Dubochet, J., and Stasiak, A. Geometry and physics of catenanes applied to the study of DNA replication. *Biophysical Journal*, 74:2815–2822, 1998.
- [30] Roca, J. Two-dimensional agarose gel electrophoresis of DNA topoisomers. *DNA Topoisomerases. Methods in Molecular Biology*, 582:27–37, 2009.
- [31] Robles, M.L., López, V., Hernandez, P. Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. 2D gels and their third-dimensional potencial. *Methods*, 57:170–178, 2012.
- [32] Baxter, J., Sen, N., Martinez, V.L., De Carandini, M.E., Schwartzman, J.B., Diffley, J.F., and Aragon, L. Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science*, 331:1328–1332, 2011.

-
- [33] López, V., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 40(8):3563–3573, 2012.
- [34] Fierro-Fernandez, M., Hernandez, P., Krimer, D.B., Stasiak, A., and Schwartzman, J.B. Topological locking restrains replication fork reversal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:1500–1505, 2007.
- [35] Viguera, E., Hernandez, P., Krimer, D.B., Lurz, R., and Schwartzman, J.B. Visualisation of plasmid replication intermediates containing reversed forks. *Nucleic Acids Res.*, 28:498–503, 2000.
- [36] Rees, D.A. Shapely polysaccharides. the eighth colworth medal lecture. *Biochem. J.*, 126:257–273, 1972.
- [37] Vologodskii, A.V., Crisona, N.J., Laurie, B., Pieranski, P., Katritch, V., Dubochet, J., and Stasiak, A. Sedimentation and electrophoretic migration of DNA knots and catenanes. *Journal of Molecular Biology*, 278:1–3, 1998.
- [38] Sogo, J.M., Stasiak, A., Martínez-Robles, M. L., Krimer, D.B., Hernández, P., and Schwartzman, J.B. Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *Journal of Molecular Biology*, 286:637–643, 1999.
- [39] Weber, C., Stasiak, A., P. De Los Rios, and G. Dietler. Numerical simulation of gel electrophoresis of DNA knots in weak and strong electric fields. *Biophysical Journal*, 90:3100–3105, 2006.
- [40] De Gennes, P. G. Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles. *J. Chem. Phys.*, 2(55):572–579, 1971.

-
- [41] van Heukelum, A., and Barkema, G.T. Lattice models of DNA electrophoresis. *Electrophoresis*, pages 2562–2568, 2002.
- [42] Heller, C., Duke, T., and Viovy, J.L. "electrophoretic mobility of DNA in gels. II. Systematic experimental study in agarose gels. *Biopolymers*, pages 249–259, 1994.
- [43] Flory, P.J. . *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, first edition, 1953.
- [44] van Heukelum, A. , Barkema, G.T. , and R.H. Bisseling. DNA electrophoresis studied with the cage model. *J. Comp. Phys.*, 2002:313–326, 2002.
- [45] M. Olvera de la Cruz, J. M. Deutsch, and S. F. Edwards. Electrophoresis in strong fields. *Phys. Rev. A*, page 2047, 1986.
- [46] Fick, A. On liquid diffusion. *Phil. Mag. J. Sci*, 10:30–39, 1855.
- [47] Maxwell, J.C. . On the dynamical theory of gases. *Phil. Trans. R. Soc.*, page 49–88, 1866.
- [48] Stefan, J. Uber das gleichgewicht und die bewegung insbesondere die diffusion von gasgemengen. *Akad. Wiss. Wien*, page 63–124, 1871.
- [49] M.J. Kadomatsu. "Simulación numérica de la movilidad electroforética de encadenados tipo A y dímeros superenrollados mediante las ecuaciones de Maxwell - Stefan.". Tesis de maestría, Facultad Politécnica de la Universidad Nacional de Asunción, 2014.
- [50] Strikwerda, J.C. *Finite Difference Schemes and Partial Differential Equations*. SIAM, 2nd edition, 2004.

-
- [51] Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N. *Transport Phenomena, Part III*. Wiley, 2nd edition, 2002.
- [52] Santamaría, D., Hernández, P., Martínez-Robles, M.L., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented ColE1 origins. *J. Mol. Biol.*, 300:75–82, 2000.
- [53] Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., and Cozzarelli, N.R. Topoisomerase IV is a target of quinolones in E.-coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:11801–11805, 1995.
- [54] Zechiedrich, E.L., and Cozzarelli, N.R. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in E. coli. *Genes Dev.*, 9:2859–2869, 1995.
- [55] Drlica, K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2:504–508, 1999.
- [56] López-Estraño, C., Schwartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. Colocalization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. *J. Molec. Biol.*, 277(2):249–256, 1998.

Apéndice A

Tabla de Rolfsen

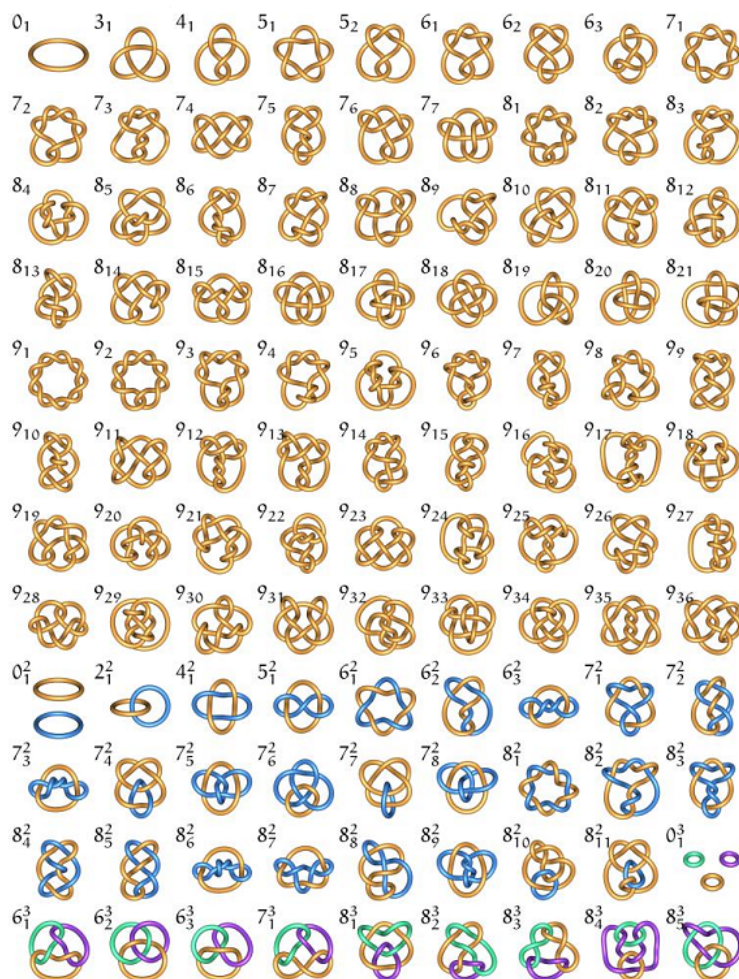


FIGURA A.1: Nudos primos de hasta 9 cruces y enlaces de hasta tres componentes clasificados según la tabla de Rolfsen usando la notación de Alexander-Briggs [5]

Apéndice B

Resultados Experimentales y Computacionales

TABLA B.1: Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,0 % y 150 V

ΔC	Superenrollados				Anudados			
	1ra Dimensión		2da Dimensión		1ra Dimensión		2da Dimensión	
	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)
0	7,30	7,31	8,00	8,04				
1	7,55	7,57	8,00	7,91	10,90	10,90	5,40	5,32
2	7,75	7,77	8,00	8,04	11,15	11,10	4,45	4,45
3	7,95	8,04	8,05	8,04	11,35	11,36	3,85	3,85
4	8,20	8,23	8,10	8,31	11,60	11,56	3,55	3,59
5	8,45	8,51	8,35	8,44	11,85	11,89	3,60	3,52
6	8,70	8,70	8,65	8,77	12,05	12,03	3,85	3,79
7	8,95	8,97	8,95	8,97	12,30	12,36	4,05	4,05
8	9,25	9,24	9,25	9,24	12,55	12,49	4,45	4,45
9	9,45	9,30	9,70	9,83	12,80	12,89	4,80	4,72
10	9,65	9,50	10,10	10,23	13,05	13,02		
11	9,85	9,70	10,55	10,70				
12	10,00	9,83	11,05	11,16				
13	10,15	9,97	11,50	11,63				
14	10,30	10,10	11,95	12,16				
15	10,40	10,30	12,45	12,49				
16	10,50	10,43	12,85	13,02				
17	10,60	10,43	13,10	13,42				
18	10,70	10,50	13,80	14,02				
19	10,75	10,63	14,25	14,29				
20	10,80	10,76						

TABLA B.2: Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,0 % y 175 V

ΔC	Superenrollados				Anudados			
	1ra Dimensión		2da Dimensión		1ra Dimensión		2da Dimensión	
	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)
0	10,30	10,43	9,55	9,57				
1	10,80	10,76	9,55	9,50	11,10	11,10	5,05	5,05
2	11,05	11,03	9,60	9,57	11,40	11,36	3,70	3,72
3	11,30	11,36	9,65	9,70	11,75	11,69	2,85	2,86
4	11,60	11,63	9,70	9,70	12,10	12,09	2,20	2,19
5	11,90	11,96	9,75	9,77	12,35	12,36	1,85	1,86
6	12,20	12,23	9,75	9,83	12,60	12,76	1,70	1,73
7	12,50	12,43	9,80	9,90	12,90	13,02	1,75	1,73
8	12,80	12,69	9,85	9,77	13,10	13,36	1,90	1,86
9	13,05	12,96	9,85	9,83			2,10	2,126
10	13,25	13,16	9,90	9,90				
11	13,45	13,42	9,95	9,97				
12	13,65	13,69	10,00	10,03				
13	13,90	13,82	10,10	10,17				
14	14,05	14,02	10,30	10,37				
15	14,20	14,22	10,60	10,50				
16			10,80	10,83				
17			11,00	11,10				

TABLA B.3: Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,0 % y 200 V

ΔC	Superenrollados				Anudados			
	1ra Dimensión		2da Dimensión		1ra Dimensión		2da Dimensión	
	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)	medido (cm)	simulado (cm)
0	10,30	10,43	7,30	7,31				
1	10,80	10,76	7,30	7,24	11,10	11,23	5,40	5,38
2	11,05	11,10	7,30	7,24	11,40	11,50	4,20	4,19
3	11,30	11,43	7,30	7,24	11,80	11,76	3,50	3,59
4	11,60	11,76	7,30	7,18	12,10	12,03	3,20	3,19
5	12,00	12,09	7,30	7,18	12,40	12,43	3,05	2,92
6	12,30	12,43	7,30	7,24	12,70	12,69	3,00	2,99
7	12,70	12,76	7,40	7,31	12,95	12,96	3,10	3,06
8	12,90	12,96	7,50	7,51	13,20	13,22	3,30	3,26
9	13,10	13,16	7,70	7,77	13,45	13,52	3,50	3,52
10	13,40	13,49	8,00	8,17			3,80	3,85
11	13,70	13,69	8,20	8,17			4,20	4,19
12	13,80	13,75	8,50	8,57			4,50	4,52
13	13,90	13,95	8,80	8,84			4,90	5,05
14	14,05	14,09	9,20	9,17			5,40	5,45
15	14,20	14,22	9,60	9,57			5,70	5,71
16	14,30	14,42	9,85	9,83				
17	14,40	14,42	10,20	10,23				
18	14,50	14,49	10,55	10,63				
19	14,55	14,62	10,90	10,83				
20	14,60	14,68	11,20	11,16				

TABLA B.4: Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 0,8 % y 150 V

ΔC	Superenrollados				Anudados			
	1ra Dimensión		2da Dimensión		1ra Dimensión		2da Dimensión	
	experim. (cm)	simulado (cm)	experim. (cm)	simulado (cm)	experim. (cm)	simulado (cm)	experim. (cm)	simulado (cm)
0	9,70	9,834	9,25	9,169				
1	10,20	10,23	9,25	9,169	10,35	10,37	7,40	7,44
2	10,45	10,43	9,25	9,302	10,65	10,63	6,50	6,58
3	10,70	10,76	9,45	9,369	10,90	10,96	6,00	5,98
4	11,10	11,16	9,65	9,568	11,20	11,16	5,75	5,71
5	11,30	11,43	9,75	9,769	11,45	11,43	5,65	5,71
6	11,70	11,76	10,00	9,967	11,70	11,63	5,75	5,85
7	12,00	11,96	10,25	10,17	11,95	11,96	5,95	5,98
8	12,20	12,16	10,55	10,56	12,20	12,26	6,25	6,31
9	12,45	12,36	10,80	10,83	12,45	12,43	6,55	6,72
10	12,65	12,62	11,10	11,10	12,70	12,76	6,95	6,91
11	12,80	12,82	11,40	11,30	12,85	13,02	7,30	7,37
12	13,00	12,96	11,70	11,69				
13	13,10	13,09	11,95	11,96				
14	13,20	13,16	12,20	12,23				
15	13,30	13,22	12,40	12,49				
16	13,40	13,36	12,70	12,76				

TABLA B.5: Resultados de la electroforesis bidimensional: 1ra dimensión en agarosa al 0,4 % y 30 V. 2da dimensión en agarosa al 1,2 % y 150 V

ΔC	Superenrollados				Anudados			
	1ra Dimensión		2da Dimensión		1ra Dimensión		2da Dimensión	
	experim. (cm)	simulado (cm)	experim. (cm)	simulado (cm)	experim. (cm)	simulado (cm)	experim. (cm)	simulado (cm)
0	9,70	9,834	5,70	5,714				
1	10,10	10,17	5,70	5,648	10,40	10,37	2,25	2,326
2	10,35	10,43	5,70	5,648	10,60	10,63	1,80	1,794
3	10,65	10,76	5,70	5,648	10,90	10,90	1,50	1,395
4	10,90	11,03	5,75	5,781	11,20	11,10	1,35	1,395
5	11,20	11,3	5,80	5,914	11,50	11,50	1,40	1,329
6	11,50	11,56	6,05	6,113	11,70	11,76	1,45	1,462
7	11,80	11,83	6,30	6,312	11,95	11,96	1,55	1,595
8	12,10	12,03	6,55	6,578	12,20	12,23	1,75	1,728
9	12,35	12,23	6,90	6,910	12,45	12,56	2,00	1,993
10	12,50	12,49	7,25	7,309	12,70	12,76	2,30	2,392
11	12,70	12,62	7,65	7,774	12,95	13,02	2,60	2,658
12	12,90	12,82	8,00	8,106	13,15	13,16	3,00	3,123
13	13,05	13,02	8,40	8,505	13,35	13,42	3,30	3,455
14	13,20	13,16	8,80	8,904	13,50	13,55	3,70	3,787
15	13,30	13,22	9,20	9,302	13,70	12,69		
16	13,45	13,36	9,60	9,635				
17	13,60	13,49	10,00	9,967				
18	13,65	13,55	10,40	10,43				
19	13,70	13,62	10,80	10,90				
20	13,75	13,75	11,10	11,23				

Apéndice C

Código del Programa

```
1  % Simulacion de la electroforesis en gel de agarosa de ...  
    ADN de Dimeros superenrollados.  
2  close all  
3  
4  R = 8.314472 ; %constante universal gases (J/mol.K)  
5  F = 96485.34; %constante de Faraday (C/mol)  
6  T = 293.16; % temperatura de trabajo (K)  
7  %% Primera Dimension  
8  
9  for z= 1:9  
10 E = 100; % potencial electrico (V/m)  
11 %wold=zeros(200-129,1);  
12 dLk = z; %(valor maximo a considerar para el dLK)  
13 vd=2.6481e-008*z + 8.7623e-007;  
14 %8.4757e-07;% regresion de la velocidad electrophoretica ...  
    del DNA m/s  
15 C= F*E/(R*T);  
16 Dw = 3*10^(-10) ; % valor de la difusividad del medio  
17 zd= -38;
```

```

18 zw= -3;
19 %vw= -0.000000001;
20 vw =1.93*vd;
21
22 % iniciacion de las variables numericas
23 n= 602; % en este caso siempre debe ser par
24 h = 0.40/(n); % longitud de un elemento
25
26 x = (0.05:0.01:0.09);
27 tpossible = zeros(size(x));
28 for g = 1:5
29     Dd(g) = -vd*x(g)/((C*(x(g)*zd + ...
        (1-x(g))*zw))+(1-x(g))*vw/Dw);
30     tpossible(g) = abs(2*x(g)*(-C*Dd(g)*(zd-zw+zw/x(g))+ ...
        vw*Dd(g)*(x(g)-1)/(Dw*x(g))-vw) + ...
        x(g)^2*(C*Dd(g)*zw/x(g)^2 + ...
        vw*Dd(g)/(Dw*x(g))-vw*Dd(g)*(x(g)-1)/(Dw*x(g)^2)) + vw);
31 end
32 t = h/max(tpossible(:));% variacion en el tiempo ...
    (h/max(f')>t
33 %entonces h/max(f'(w))*0.9) da un valor menor.
34 nt= 3600*25/t ;% 30 horas corridas dividido el paso del tiempo
35 %h/t<1 se debe cumplir esta condicion
36
37 %inicializacion de las condiciones iniciales de la ...
    saturacion
38 KnSat=[0.15 0.13 0.11 0.09 0.09 0.08 0.07 0.06 0.06 0.05 ...
    0.04];
39 KnD=0.8*KnSat';
40 k = 1;
41 w(1:n,k) = 0.000000001* ones(n,k);
42 for i = 5:9 % (n-1)/2-10:(n-1)/2+10
43     w(i,k) = KnD(z+1);

```

```

44 end
45 %v = -C*Dd*(zd-zw+zw/w) + vw*Dd/(Dw*w)*(w-1);
46
47 % inicializacion del calculo del flujo
48 %Dd = -vd*w(i,k)/(C*(w*(i,k)*zd ...
49 %Fl = w^2*(v-vw)+w*vw;
50 for k= 1:nt
51     w(1,k+1)=w(1,k);
52     w(n,k+1)= w(n,k);
53     for i = 2:n-1
54         Dd1 = -vd*w(i-1,k)/(C*(w(i-1,k)*zd ...
55             +(1-w(i-1,k))*zw)+(1-w(i-1,k))*vw/Dw);
56         Dd1=Dd1*1;
57         Dd2 = -vd*w(i,k)/(C*(w(i,k)*zd ...
58             +(1-w(i,k))*zw)+(1-w(i,k))*vw/Dw);
59         Dd2=Dd2*1;
60         Dd3 = -vd*w(i+1,k)/(C*(w(i+1,k)*zd ...
61             +(1-w(i+1,k))*zw)+(1-w(i+1,k))*vw/Dw);
62         Dd3=Dd3*1;
63         v1 = -C*Dd1*(zd-zw+zw/w(i-1,k)) + ...
64             vw*Dd1/(Dw*w(i-1,k))*(w(i-1,k)-1);
65         v2 = -C*Dd2*(zd-zw+zw/w(i,k)) + ...
66             vw*Dd2/(Dw*w(i,k))*(w(i,k)-1);
67         v3 = -C*Dd3*(zd-zw+zw/w(i+1,k)) + ...
68             vw*Dd3/(Dw*w(i+1,k))*(w(i+1,k)-1);
69         FL = 0.5*(w(i-1,k)^2*(v1-vw)+w(i-1,k)*vw + ...
70             w(i,k)^2*(v2-vw)+w(i,k)*vw);
71         FR = 0.5*(w(i+1,k)^2*(v3-vw)+w(i+1,k)*vw + ...
72             w(i,k)^2*(v2-vw)+w(i,k)*vw);
73         w(i,k+1) = 0.5*(w(i-1,k)+w(i+1,k)) -0.5*t/h*(FR-FL);
74     end
75 end
76
77
78

```

```

69  % 2DA DIMENSION
70  E = 500; % potencial electrico (V/m) (150V/30cm)
71  m=z;
72  vd = -2.0898e-011*m.^6+ 6.8814e-010*m.^5 ...
      -8.8432e-009*m.^4 + 5.3813e-008*m.^3 ...
      -1.3185e-007*m.^2 -3.0865e-008*m+1.0542e-006;
73  C= F*E/(R*T);
74  vw =2.035*vd;
75  Dw = 3*10^(-8);
76  tpossible = zeros(size(x));
77  for g = 1:5
78  Dd(g) = -vd*x(g)/( (C*(x(g)*zd +(1-x(g))*zw)) ...
      +(1-x(g))*vw/Dw);
79
80  tpossible(g) = abs(2*x(g)*(-C*Dd(g)*(zd-zw+zw/x(g)) + ...
      vw*Dd(g)*(x(g)-1)/(Dw*x(g))-vw)+ ...
      x(g)^2*(C*Dd(g)*zw/x(g)^2 + ...
      vw*Dd(g)/(Dw*x(g))-vw*Dd(g)*(x(g)-1)/(Dw*x(g)^2)) + vw);
81  end
82
83  t = h/max(tpossible(:));% variacion en el tiempo ...
      (h/max(f')>t
84  entonces h/max(f'(w))*0.9) da un valor menor.
85  nt2= 3600*16/t ;% horas corridas divido el paso del tiempo
86  k = 1;
87  w2(1:n,k) = w(:,round(nt));
88  for k= 1:nt2
89  w2(1,k+1)=w2(1,k);
90  w2(n,k+1)= w2(n,k);
91  for i = 2:n-1
92  Dd1 = -vd*w2(i-1,k)/(C*(w2(i-1,k)*zd ...
      +(1-w2(i-1,k))*zw)+(1-w2(i-1,k))*vw/Dw);
93  Dd1=Dd1+1;

```

```

94   Dd2 = -vd*w2(i,k)/(C*(w2(i,k)*zd ...
      + (1-w2(i,k))*zw)+(1-w2(i,k))*vw/Dw);
95   Dd2=Dd2*1;
96   Dd3 = -vd*w2(i+1,k)/(C*(w2(i+1,k)*zd ...
      + (1-w2(i+1,k))*zw)+(1-w2(i+1,k))*vw/Dw);
97   Dd3=Dd3*1;
98
99   v1 = -C*Dd1*(zd-zw+zw/w2(i-1,k)) + ...
      vw*Dd1/(Dw*w2(i-1,k))*(w2(i-1,k)-1);
100  v2 = -C*Dd2*(zd-zw+zw/w2(i,k)) + ...
      vw*Dd2/(Dw*w2(i,k))*(w2(i,k)-1);
101  v3 = -C*Dd3*(zd-zw+zw/w2(i+1,k)) + ...
      vw*Dd3/(Dw*w2(i+1,k))*(w2(i+1,k)-1);
102
103  FL = 0.5*(w2(i-1,k)^2*(v1-vw)+w2(i-1,k)*vw + ...
      w2(i,k)^2*(v2-vw)+w2(i,k)*vw);
104  FR = 0.5*(w2(i+1,k)^2*(v3-vw)+w2(i+1,k)*vw + ...
      w2(i,k)^2*(v2-vw)+w2(i,k)*vw);
105
106  w2(i,k+1) = 0.5*(w2(i-1,k)+w2(i+1,k)) -0.5*t/h*(FR-FL);
107  end
108  end

```

Apéndice D

Presentaciones en congresos internacionales

- Cebrián; Castán; PARRA; Kadomatsu-Hermosa; Martínez; Fernández-Nestosa; Schaerer; Hernández; Schvartzman; Krimer. "Electrophoretic Mobility of Catenated, Knotted and Supercoiled DNA Molecules". XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), Granada. 2014. Póster.
- Castán; Kadomatsu-Hermosa; Cebrián; PARRA; Martínez; Fernández-Nestosa; Schaerer; Hernández; Schvartzman; Krimer (2014). "Electrophoretic Mobility of Catenated and Supercoiled DNA Molecules". Gordon Research Conferences, DNA Topoisomerases in Biology & Medicine, Newry, 2014. Póster.
- Cebrián; Castán; PARRA; Martínez; Kadomatsu; Fernández-Nestosa; Krimer; Hernández; Schvartzman; Schaerer; "Decatenation and Unknotting During DNA Replication". DNA Topoisomerases in Biology & Medicine From Molecular Structure to Drug Targeting Newry 2014.

- Martínez; PARRA; Cebrián; Castán; Kadomatsu-Hermosa; Fernández-Nestosa; Schaerer; Hernández; Krimer; Schvartzman; "Role of type II topoisomerases in regulation of supercoiling and pre-catenation in replication intermediates of DNA". 3rd Conference for Computational Interdisciplinary Sciences (CCIS) Asunción 2014.
- Kadomatsu-Hermosa; PARRA; Cebrián; Castán; Martínez; Fernández-Nestosa; Schaerer; Hernández; Krimer; Schvartzman. "Simulation of the Electrophoretic Mobility of Supercoiled and Catenated DNA Molecules". 3rd Conference for Computational Interdisciplinary Sciences (CCIS), Asunción. 2014. Póster

Artículos publicados en revistas científicas

Se anexan también artículos completos publicados en revistas arbitradas.

Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules

Jorge Cebrián¹, Maridian J. Kadomatsu-Hermosa², Alicia Castán¹, Víctor Martínez², Cristina Parra², María José Fernández-Nestosa², Christian Schaerer², María-Luisa Martínez-Robles¹, Pablo Hernández¹, Dora B. Krimer¹, Andrzej Stasiak^{3,*} and Jorge B. Schwartzman^{1,*}

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain, ²Scientific and Applied Computing Laboratory, Polytechnic School, National University of Asunción, P.O. Box 2111, SL. San Lorenzo, Paraguay and ³Center for Integrative Genomics, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Received September 15, 2014; Revised November 12, 2014; Accepted November 13, 2014

ABSTRACT

We systematically varied conditions of two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis to optimize separation of DNA topoisomers that differ either by the extent of knotting, the extent of catenation or the extent of supercoiling. To this aim we compared electrophoretic behavior of three different families of DNA topoisomers: (i) supercoiled DNA molecules, where supercoiling covered the range extending from covalently closed relaxed up to naturally supercoiled DNA molecules; (ii) postreplicative catenanes with catenation number increasing from 1 to ~15, where both catenated rings were nicked; (iii) knotted but nicked DNA molecules with a naturally arising spectrum of knots. For better comparison, we studied topoisomer families where each member had the same total molecular mass. For knotted and supercoiled molecules, we analyzed dimeric plasmids whereas catenanes were composed of monomeric forms of the same plasmid. We observed that catenated, knotted and supercoiled families of topoisomers showed different reactions to changes of agarose concentration and voltage during electrophoresis. These differences permitted us to optimize conditions for their separation and shed light on physical characteristics of these different types of DNA topoisomers during electrophoresis.

INTRODUCTION

Two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis is the method of choice to separate the topoisomers of any given

circular DNA molecule (1–3). It basically consists in two consecutive runs of electrophoresis performed under different conditions and run at two orthogonal directions (4–8). One of its versions, originally designed by Bell and Byers (4) to separate branched and linear molecules, was subsequently adapted to characterize the replication intermediates (RIs) of any given linear DNA fragment (9). This method is now widely used to map replication origins, termination sites, replication fork stalling and even molecules containing reversed forks (9–13). In this version, the first dimension usually occurs in a low percentage agarose gel (~0.4%) run at a relatively low voltage (~1 V/cm). The second dimension occurs perpendicular to the first one, but in a higher percentage agarose gel (~1%) run at higher voltage (~5–6 V/cm). It was early noticed that this method could also be successfully applied to analyze different topological forms (14). Supercoiled, catenated and knotted forms are clearly identified as they react in a different way to changes of electrophoretic conditions (15). Several reports demonstrated that in low concentration agarose gels run at low voltage the electrophoretic mobility of different DNA knots and catenanes systematically increases with the average crossing number (ACN), these molecules show in an unperturbed form, since for molecules with the same chain length an increase of ACN necessities increase of overall compaction (16–19). Here, we used low voltage and low agarose concentration during the first dimension and several different conditions during the second dimension of a 2D gel system to examine the roles of voltage and agarose concentration on the electrophoretic mobility of three families of topoisomers with the same mass: supercoiled dimers (ScDimers), nicked-knotted dimers (KnDimers) and monomeric-nicked catenanes (CatAs). Cartoons illustrating these topoisomers

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 91 837-3112 (Ext 4232); Fax: +34 91 536-0432; Email: schvartzman@cib.csic.es
Correspondence may also be addressed to Andrzej Stasiak. Tel: +41 21 692 4282; Fax: +41 21 692 2205; Email: andrzej.stasiak@unil.ch

© The Author(s) 2014. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

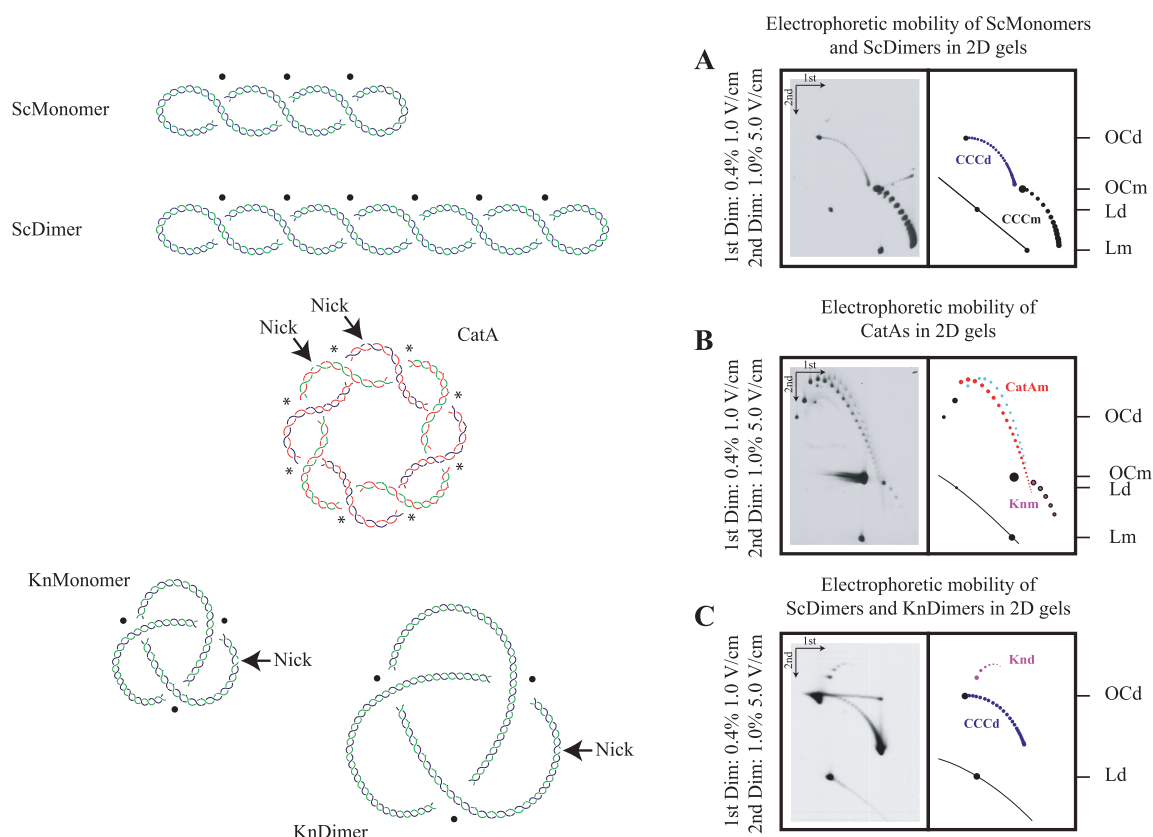


Figure 1. Cartoons and analysis of different topoisomers in two-dimensional (2D) agarose gels. A supercoiled monomer (ScMonomer), supercoiled dimer (ScDimer), nicked-catenated monomers (CatA), nicked-knotted monomer (KnMonomer) and nicked-knotted dimer (KnDimer) are represented. They all have the same mass and similar density of crossings (see text). Intramolecular crossings are marked with a black spot while intermolecular ones are pointed with an asterisk. The catenated rings in CatA are drawn in blue and red and in green and red to distinguish each of them. Immunograms of DNA samples enriched for different topoisomers analyzed by high-resolution 2D agarose gel electrophoresis are shown to the right: (A) DNA sample enriched for supercoiled monomers (CCCm) and dimers (CCCd). (B) DNA sample enriched for nicked-catenated monomers (CatAm) and knotted monomers (Knm). (C) DNA sample enriched for supercoiled dimers (CCCd) and knotted dimers (Knd). Electrophoresis conditions are detailed to the left of each immunogram. Interpretative diagrams are shown to the right. In these diagrams and the following figures supercoiled dimers (CCCd) are called ScDimers and are depicted in dark blue, nicked-catenated monomers (CatAm) are called CatAs and are depicted in red, and nicked-knotted dimers (Knd) are called KnDimers and are depicted in pink.

are shown in Figure 1. Supercoiled and nicked-knotted monomers are also shown. To facilitate further discussion, we chose to draw representatives of three different families of topoisomers in such a way that they show a similar density of crossings. Comparison of supercoiled, knotted and catenated molecules is not trivial. The essential concepts of DNA topology have been treated in detail in several books and reviews (20–23). In short, in the case of supercoiled DNA molecules their average shape, which is an important factor affecting electrophoretic mobility, depends on the extent of torsional stress acting on the molecules and this in turn depends on how much the linking number of a given supercoiled DNA molecule differs from the linking number of another covalently closed molecule with the same nucleotide sequence. In the case of catenanes analyzed here, molecules were nicked and thus released of torsional stress but they differed in the extent of their catena-

tion number, which informs how many times one double-stranded DNA molecule is topologically linked with the other (24). The differences in catenation number affect the average shape and deformability of catenanes. Finally for the knotted DNA molecules analyzed here, which were also nicked, their shape and deformability depends on the type of formed knots where more complex knots, with higher number of crossings reach a more compact shape than less complex knots (23). As schematically illustrated in Figure 1, ScDimers, KnDimers and CatAs are molecular species of the same mass. For the molecules we chose to examine, the mass of pBR18 monomers is 4383 bp and for dimers it corresponds to 8766 bp. For covalently closed circles (CCCs) the stepwise changes of their electrophoretic mobilities are the consequence of different linking numbers (Lk). For CatAs these stepwise changes are the consequence of different catenation numbers (Ca). For nicked, knotted circles,

finally, the stepwise changes in their electrophoretic mobilities are the consequence of different knot types where the decisive contribution comes from different minimal number of crossings characterizing any given knot, although different types of knots with the same minimal crossing number show slightly different electrophoretic mobility (18). Torus type of catenanes and twist type of knots with increasing number of crossings are expected to form regularly spaced bands in arcs of catenated and of knotted DNA molecules. Here we decided to compare the electrophoretic mobility of ScDimers, KnDimers and CatAs based on the empirical observation that for individual members within each family this mobility changes stepwise (Figures 2 and 4). We attributed these changes in mobility to changes in molecular shape that occur stepwise and are results of differences of topological complexity (ΔC). ΔC is a practical measure that tells how many spaces between DNA bands on a given arc (of supercoiled, of nicked catenated and of nicked knotted molecules) separate a given form from a band formed by simple not-supercoiled DNA circles of the same size. Each point in the graphs shown in Figures 3, 5, 6 and 7 and Supplementary Tables S1–S6 corresponds to the electrophoretic mobility expressed in mm/h of individual spots of each family of topoisomers identified in the immunograms of Figures 2 and 4.

The results obtained indicated that the contribution of increasing ΔC to electrophoretic mobility differed for ScDimers, KnDimers and CatAs depending on the conditions of electrophoresis applied.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and culture medium

The *Escherichia coli* strains used in this study were DH5 α F' (supplied by Santiago Rodríguez de Córdoba), parE10 (provided by Ian Grainge) and LZ38 (supplied by Lynn Zechiedrich). Their relevant genotypes are detailed below:

DH5 α F'	F'/gyrA96(Nalr) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 (r _k ⁺ m _k ⁺) glnV44 deoR Δ (lacZYA-argF)U169[F80d Δ (lacZ)M15]
parE10	W3110 F- except [parE10 recA]
LZ38	F- λ (P80 red114 xis-1 cl857) zei-723::Tn10 parCK84::kan

Competent cells were transformed with monomeric (4383 bp) or dimeric forms (8766 bp) of pBR18, a derivative of pBR322 where the tetracycline resistance promoter was replaced with the poly-linker of pUC18 (12). DH5 α F' and LZ38 cells were grown in LB medium at 37°C while parE10 cells were grown at 30°C. In all cases, 75 μ g/ml ampicillin was added to the LB medium. Isolation of plasmid DNA was performed as described elsewhere (25,26).

Cell and DNA treatments

We used norfloxacin to inhibit wild-type DNA gyrase and topoisomerase IV (Topo IV) *in vivo* as described elsewhere (27,28). Drug-resistant mutants allowed us to selectively inhibit DNA gyrase or Topo IV. Cells were treated with 15

or 156 μ M Norfloxacin for 15–30 min just before harvest. In all cases the DNA samples analyzed were prepared from separately isolated pools of supercoiled DNAs mixed *in vitro* with nicked forms of knotted or catenated molecules.

To induce single-stranded breaks, DNA was digested with *N*b.BsmI (New England Biolabs) for 1 h at 8 U/ μ g of DNA at 50°C. Reactions were blocked with 100 μ g/ml proteinase K (Roche) for 30 min at 37°C (29).

agarose gel electrophoresis and Southern transfer

The first dimension was in a 0.4% agarose gel in TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) at 1.0 V/cm at room temperature for 25–30 h. The second dimension was in a 0.8–1.2% agarose gel in TBE buffer that was run perpendicular to the first dimension. The dissolved agarose was poured around the excised agarose lane from the first dimension and electrophoresis was at 5–6.6 V/cm in a 4°C cold chamber for 8–22 h. Southern transfer was performed as described before (30).

Non-radioactive hybridization

DNA probes were labeled with digoxigenin using the DIG-High Prime kit (Roche). Membranes were prehybridized in a 20 ml prehybridization solution (2 $\times$ SSPE (Saline Sodium-Phosphate-EDTA), 0.5% Blotto, 1% SDS, 10% dextran sulfate and 0.5 mg/ml sonicated and denatured salmon sperm DNA) at 65°C for 4–6 h. Labeled DNA was added and hybridization lasted for 12–16 h. Hybridized membranes were sequentially washed with 2 $\times$ SSC (Saline Sodium-Citrate) and 0.1% SDS at room temperature for 5 min twice and with 0.1 $\times$ SSC and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) at 68°C for 15 min twice as well. Detection was performed with an antidigoxigenin-AP conjugate antibody (Roche) and CDP-Star (Perkin Elmer) according to the instructions provided by the manufacturer.

RESULTS

To obtain broad spectrum of topoisomers of supercoiled dimeric forms of pBR18 we transformed *E. coli* LZ38 cells (31,32) with pBR18 (12). These cells are recA⁺ and accumulate monomeric as well as multimeric forms of the plasmid. In addition they bear a mutation in the parC gene that turns Topo IV resistant to Norfloxacin. This drug inhibits both bacterial type 2 DNA topoisomerases (33), but as in LZ38 cells Topo IV is resistant to Norfloxacin, only DNA gyrase is preferentially affected (34). In this way, it was clearly shown that suboptimal concentrations of the drug turn plasmids poorly supercoiled and monomeric as well as dimeric topoisomers become clearly distinguished (Figure 1A). A similar result could be obtained using chloroquine 2D gels. However, chloroquine would not have helped to separate nicked DNA forming different knots and catenanes since in these molecules the DNA is not under a torsional constraint. The aim of our investigation was to have a good way of separating various topological forms including different types of nicked knots and catenanes.

To obtain DNA preparations enriched in catenanes we transformed *E. coli* DH5 α F' cells (35) with the same plasmid. These cells are recA[−] and for this reason few if any

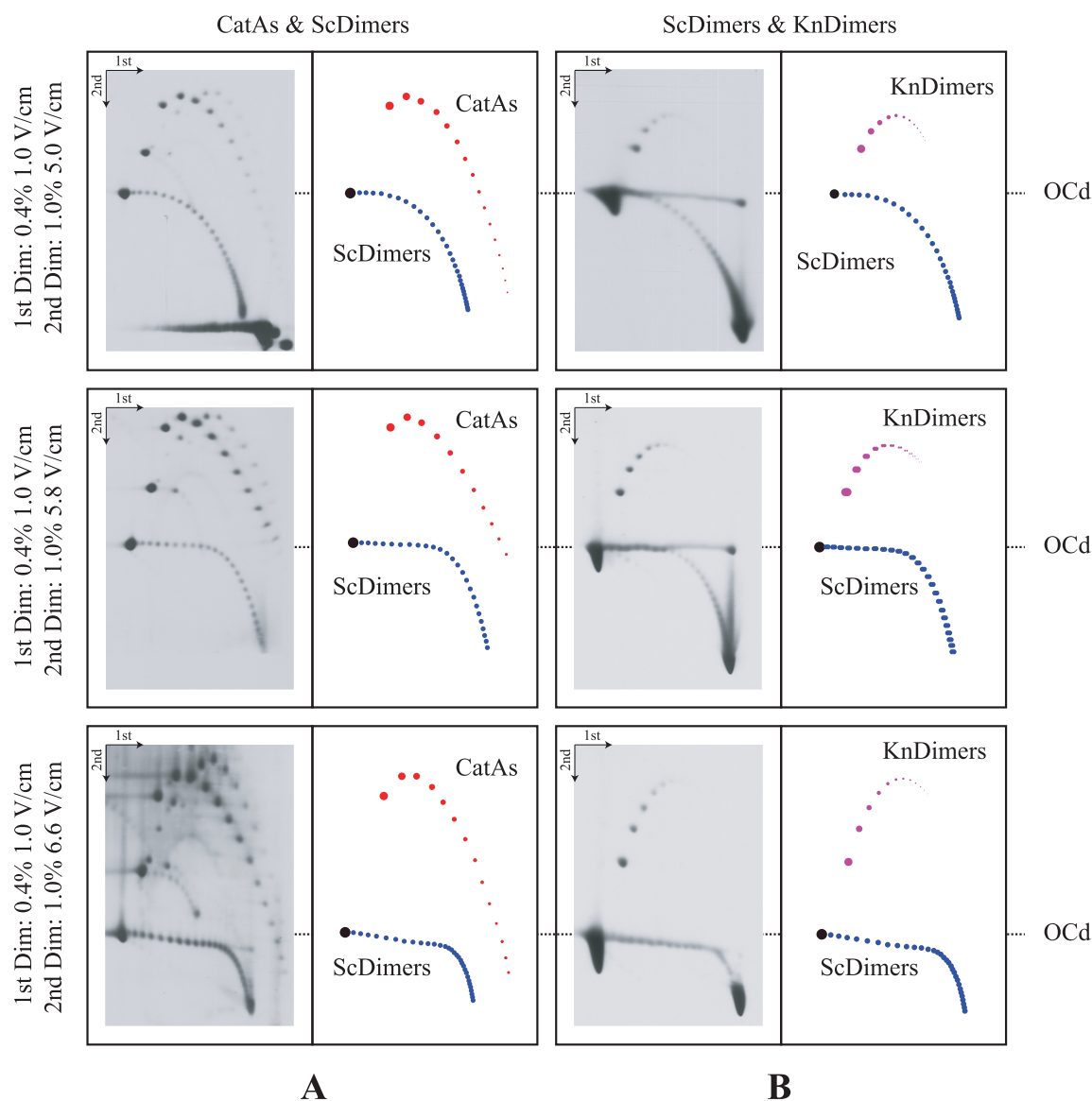


Figure 2. Immunograms of mixed DNA samples enriched for CatAs, ScDimers and KnDimers analyzed by 2D agarose gel electrophoresis where the second dimension was run in 1.0% agarose gels at different voltages. Electrophoresis conditions are detailed to the left and interpretative diagrams are shown to the right. OCd refers to the mobility of dimeric open circles used to align the different immunograms. CatAs are depicted in red, ScDimers in dark blue and KnDimers in pink.

multimers form. In addition, DH5 α F['] cells bear a mutation in the *gyrA* gene that turns DNA gyrase resistant to Norfloxacin. Therefore, in these cells Norfloxacin inhibits only Topo IV leading to the accumulation of catenated duplexes (34,36). Once isolated this DNA was digested with the nicking enzyme *Nb.BsmI* to eliminate supercoiled forms and convert all catenanes into CatAs (Figure 1B).

To obtain knotted dimers, we transformed *E. coli* parE10 cells (37) with pBR18 dimers and the cells were exposed to 15 μ M Norfloxacin to partially relax unreplicated supercoiled molecules (34). In this way, supercoiled and knotted dimers could be visualized in the same 2D gel (Figure 1C).

Using the appropriate mixture of DNAs isolated from the different cell types, the electrophoretic mobility of CatAs and ScDimers on one hand, and ScDimers and KnDimers

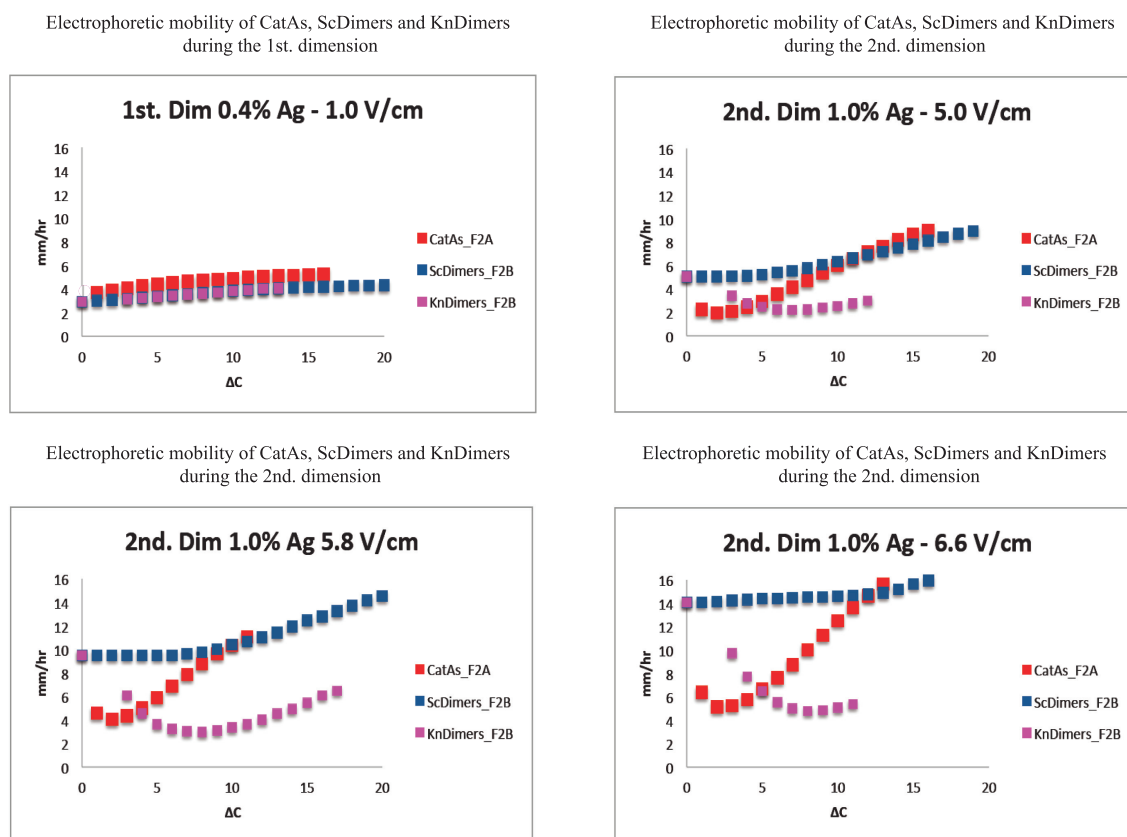


Figure 3. Comparison of the electrophoretic mobility of different topoisomers during the first and second dimension of 2D gels where the latter occurred at different voltages. Electrophoretic mobility as a function of ΔC is expressed in mm/h for the CatAs (depicted in red) shown in Figure 2A and for the ScDimers (depicted in dark blue) and KnDimers (depicted in pink) shown in Figure 2B. The actual numbers are shown in Supplementary Tables S1–S4.

on the other hand, were analyzed in 2D gel systems where the second dimension of the 2D gel system run at different voltages and agarose concentrations (Figures 2–4 and 5). ScDimers were analyzed in two different experiments (Figure 2A and B). Their electrophoretic mobility during the first and second dimensions varied slightly between experiments although the differences were not significant. Therefore, for comparison with the mobility of other topoisomers we used the figures of ScDimers observed in Figure 2B. The electrophoretic mobility of different topoisomers, with their corresponding increase in topological complexity (ΔC), expressed in mm/h was compared during the first and the second dimensions and also for the different electrophoretic conditions used during the second dimension (Figures 3, 5, 6 and 7). The actual figures are shown in Supplementary Tables S1–S6.

The results shown in Figures 2–6 confirmed that the electrophoretic mobility of different topoisomers analyzed (ScDimers, KnDimers and CatAs) increased with their expected overall compaction when the molecules were analyzed in low percentage agarose gels run at low voltage (16–19). The electrophoretic mobility for all the families ana-

lyzed during the first dimension of the 2D gel system used, run in 0.4% agarose gels at 1 V/cm, systematically increased with the expected increase of the overall compaction of the molecules. However, this was not the case anymore for the electrophoretic runs used during the second dimension. To identify the roles of voltage and agarose concentration on the electrophoretic mobility of the different topoisomers, we run the second dimension of the 2D gel system in 1% agarose gels at three different voltages: 5.0, 5.8 and 6.6 V/cm (Figures 2 and 3) or at the same voltage (5.0 V/cm) but in agarose gels of three different concentrations: 0.8, 1.0 and 1.2% (Figures 3 and 5).

The electrophoretic mobility of different topoisomers of the same mass and $\Delta C = 1$ during the first dimension (run in 0.4% agarose gels at 1.0 V/cm) varied between 3.02 mm/h (for ScDimers) and 3.70 mm/h (for CatAs). During the second dimension (run in 1% agarose gels at 5.0, 5.8 and 6.6 V/cm, respectively) these figures were 5.06, 9.49 and 14.09 mm/h for ScDimers and 2.25, 4.59 and 6.38 mm/h for CatAs. Note that the simplest KnDimer, the trefoil knot, has three nodes (18,19). The electrophoretic mobility of all these topoisomers as their ΔC increased was significantly

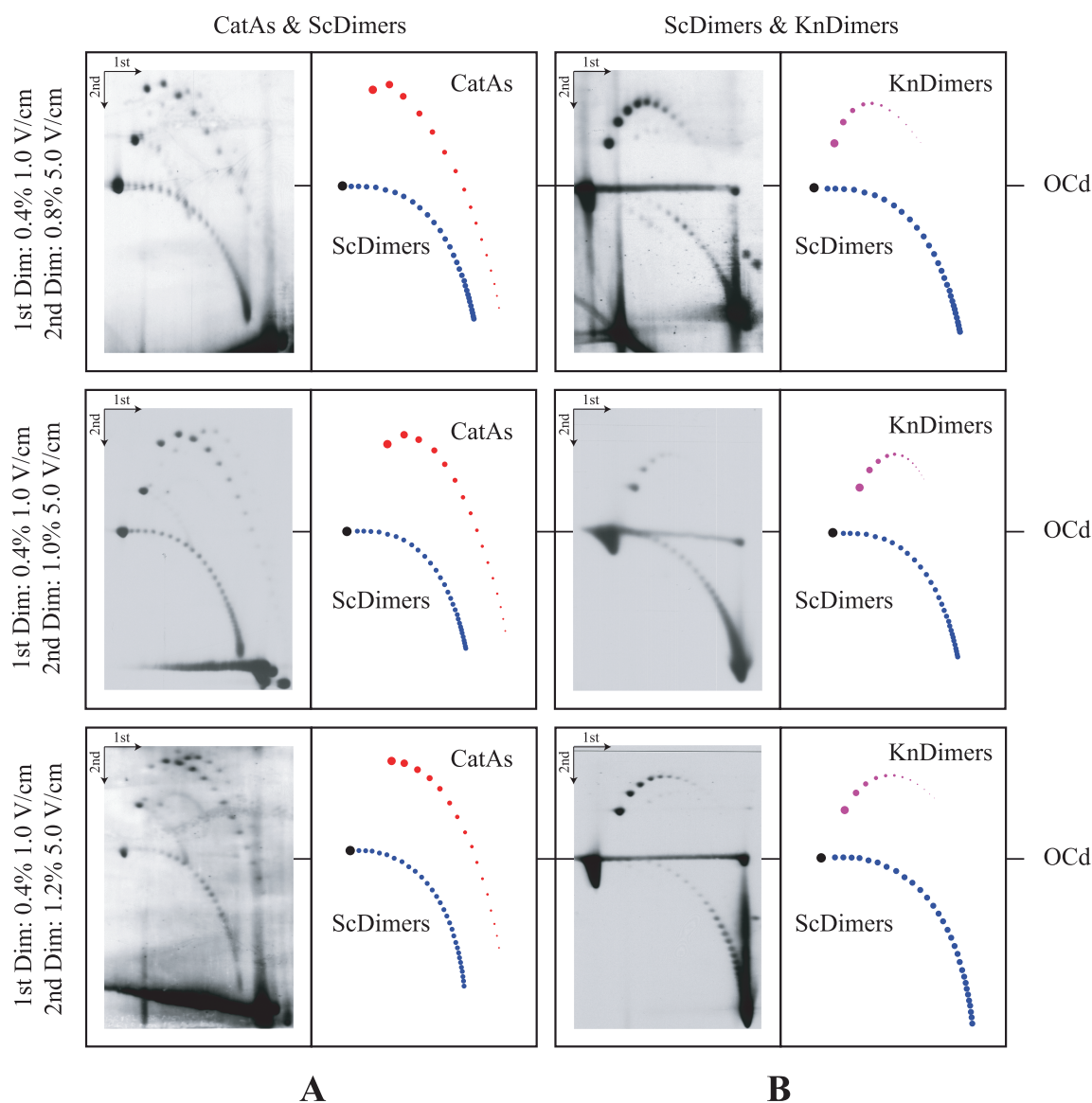


Figure 4. Immunograms of mixed DNA samples enriched for CatAs, ScDimers and KnDimers analyzed by 2D agarose gel electrophoresis where the second dimension was run at the same voltage (5.0 V/cm) in agarose gels of different concentrations. Electrophoresis conditions are detailed to the left and interpretative diagrams are shown to the right. OCd refers to the mobility of dimeric open circles used to align the different immunograms. CatAs are depicted in red, ScDimers in dark blue and KnDimers in pink.

different from each other (Figures 2 and 3 and Supplementary Tables S1–S4). These differences became manifested when the relative mobility of the molecules with increasing ΔC within each family were expressed with respect to that one shown by the simplest member of the family (Figure 6). Note that during the second dimension for molecules with low ΔC , except for ScDimers, the electrophoretic mobility was inversely proportional to their ΔC (Figure 6). This

behavior was particularly evident for KnDimers where the electrophoretic mobility remained retarded up to molecules with $\Delta C = 8$. Surprisingly, for ScDimers during the second dimension, the electrophoretic mobility of topoisomers with increasing ΔC remained fairly constant up to $\Delta C = 6, 8$ and 14 in gels run at $5.0, 5.8$ and 6.6 V/cm, respectively (Figures 2 and 3). On the other hand, during this second dimension, the behavior of CatAs was also curious.

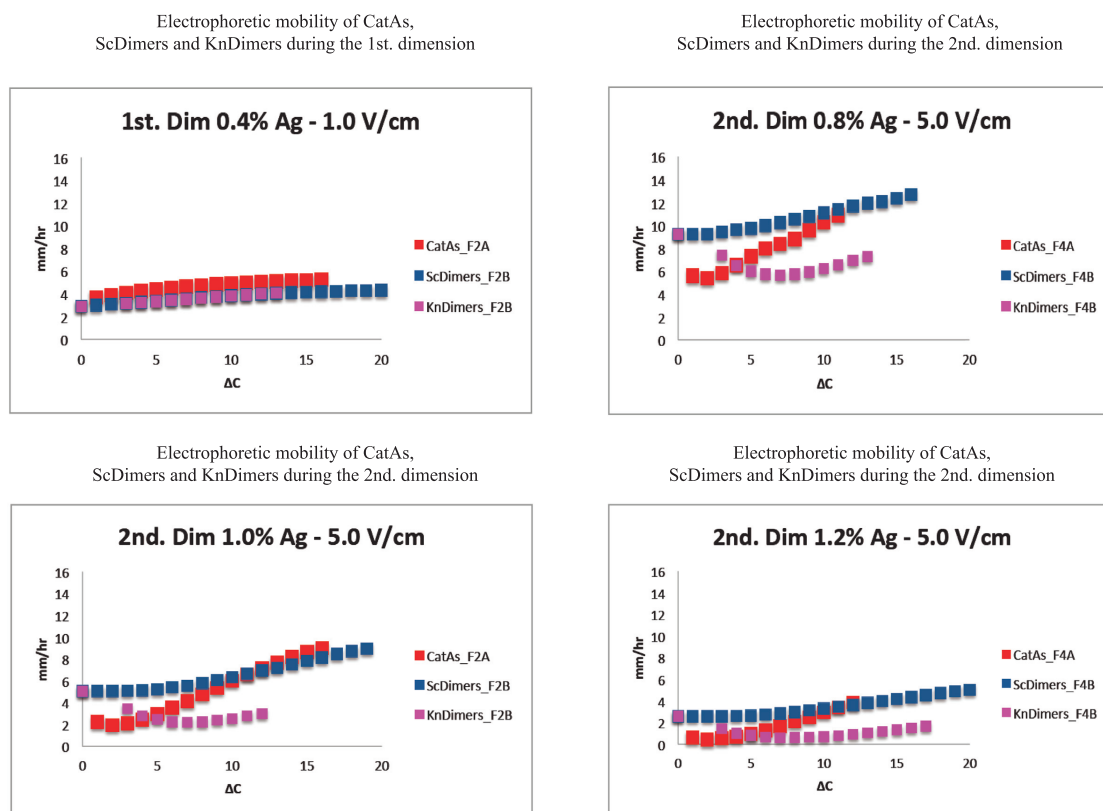


Figure 5. Comparison of the electrophoretic mobility of different topoisomers during the first and second dimension of 2D gels where the latter occurred in gels of different agarose concentrations. Electrophoretic mobility as a function of ΔC is expressed in mm/h for the CatAs (depicted in red) shown in Figure 4A and for the ScDimers (depicted in dark blue) and KnDimers (depicted in pink) shown in Figure 4B. The actual numbers are shown in Supplementary Tables S1, S2, S5 and S6).

Their electrophoretic mobility was retarded for the first 2–4 ΔC species but gained mobility very fast with each additional ΔC thereafter. This behavior expanded with increasing voltage. Precisely the opposite was observed for KnDimers. In other words, during the second dimension, as voltage increased at a constant agarose concentration (1%) topoisomers with increasing ΔC behaved differently. For molecules with relatively low ΔC ($> 2-4 < 10-15$), CatAs gained mobility fast, ScDimers gained very little mobility while KnDimers reduced their mobility (Figures 2 and 3).

The effect of agarose concentration at a constant voltage (5.0 V/cm) during the second dimension, on the other hand, was significantly different (Figures 4 and 5 and Supplementary Tables S5 and S6). The electrophoretic mobility of CatAs and ScDimers with $\Delta C = 1$ decreased from 5.60 and 9.25 mm/h (in 0.8% agarose gels) to 0.64 and 2.59 mm/h (in 1.2% agarose gels), respectively. For trefoil KnDimers, their electrophoretic mobility decreased from 7.40 mm/h (in 0.8% agarose gels) to 1.45 mm/h (in 1.2% agarose gels). This behavior applied to almost all topoisomers with increasing ΔC .

In short, the electrophoretic mobility of all topoisomers studied decreased as agarose concentration increased. This behavior progressively turned the shape of the different curves alike (Figure 5).

DISCUSSION

As previously mentioned, it was repeatedly shown that the electrophoretic mobility of different DNA knots and catenanes is proportional to the compactness of their unperturbed equilibrium shapes when analyzed in low concentration agarose gels run at low voltage (16–19). The behavior of these topoisomers in high concentration agarose gels run at relatively high voltage received considerable less attention (3). Bell and Byers (4) analyzed X-shaped and linear molecules in 2D gels where the first dimension run in a 0.7% agarose gel at 0.75 V/cm whereas the second dimension run in a 1.5% agarose gel at 2.0 V/cm. An inversion in electrophoresis mobility was observed using a similar 2D gel version for knotted replication intermediates, linear frag-

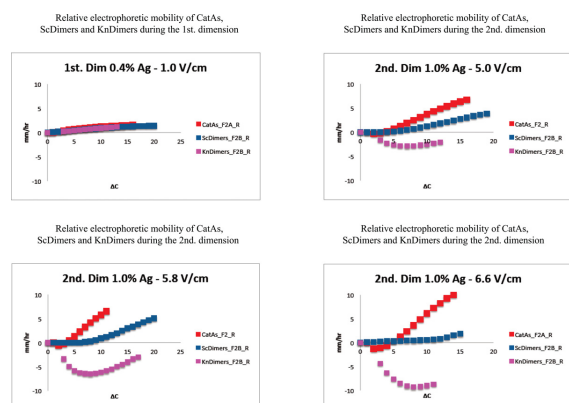


Figure 6. Comparison of the relative electrophoretic mobility of different topoisomers during the first and second dimension of 2D gels where the latter occurred at different voltages. The relative electrophoretic mobility (referred to the mobility of molecules with increasing ΔC within each family expressed with respect to that one shown by the simplest member of the family) is expressed in mm/h for the CatAs (depicted in red) shown in Figure 2A and for the ScDimers (depicted in dark blue) and KnDimers (depicted in pink) shown in Figure 2B. The actual numbers are shown in Supplementary Tables S1–S4).

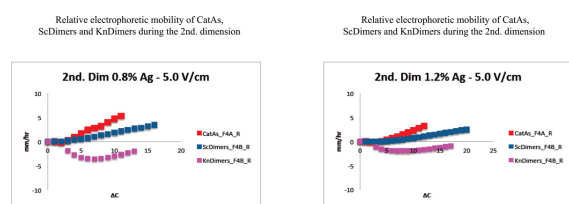


Figure 7. Comparison of the relative electrophoretic mobility of different topoisomers during the second dimension of 2D gels that occurred in gels of different agarose concentrations. The relative electrophoretic mobility (referred to the mobility of molecules with increasing ΔC within each family expressed with respect to that one shown by the simplest member of the family) is expressed in mm/h for the CatAs (depicted in red) shown in Figure 4A and for the ScDimers (depicted in dark blue) and KnDimers (depicted in pink) shown in Figure 4B. The actual numbers are shown in Supplementary Tables S5 and S6).

ments containing an internal knotted bubble (25,38–41). Weber *et al.* used Monte Carlo simulations to investigate the reasons for this reversal of relative order of electrophoretic mobility and concluded that at high electric fields the simulated knotted molecules tend to hang over the gel fibers (42–44). Earlier studies demonstrated that relatively large supercoiled DNA molecules have branched structure (45) and that this may play a significant role in their electrophoretic mobility. Here, we report that the electrophoretic mobility of CatAs, ScDimers and KnDimers with the same molecular mass systematically increased with their progressing compaction during the first dimension of a 2D gel system run in a 0.4% agarose gel at 1.0 V/cm. However, during the second dimension, run in a 0.8–1.2% agarose gel at 5.0–6.6 V/cm knotted and catenated DNA molecules were initially decreasing their electrophoretic mobility with their increasing topological complexity. We propose that when gel

pore sizes become smaller than the dimensions of undisturbed equilibrium shapes of analyzed DNA molecules, the deformability and thus the easiness of the molecules to pass through the gel pores becomes the limiting factor of their electrophoretic mobility (46–49). In the case of knotted or catenated DNA molecules, there are two partially opposing effects of increasing topological complexity: (i) A decrease of the spatial extent of the molecules measured by such observables as radius of gyration or the average inverse distance, (ii) An increase of resistance toward further compaction. In low concentration gels where the gel pore sizes are large, the molecules do not need to be squeezed to pass through the gel pores. In such a situation, their electrophoretic mobility simply increases with the complexity of knots and catenanes since more knotted and more catenated DNA molecules are more compact. In gels with higher concentration of agarose, where gel pores are smaller than the average equilibrium size for weakly knotted or catenated DNA molecules, these species experience more difficulties to pass through gel pores than unknotted and uncaterated DNA molecules of the same size that can easily squeeze through the pores. For a simple ring to pass through a narrow pore, it is only needed for two regions to be strongly bent. For knotted and catenated DNA molecules at least four regions need to be strongly bent and this requires more work for every passage through a pore. This finally results in a slower electrophoretic mobility. As knots and catenanes become very complex (more than eight crossings for knots and more than six crossings for catenanes) the molecules increase again their electrophoretic mobility as their knotting and catenation cause strong DNA bending that facilitates passage through the narrow pores in the gel.

In practical terms, for circular molecules of ~8000 bp, we propose that the best way to distinguish all topoisomers is to run the first dimension in a 0.4% agarose gel at 1.0 V/cm and the second dimension in a 1.0% agarose gel at 6.6 V/cm (Figures 2 and 3).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Lynn Zechiedrich, Ian Grainge, Santiago Rodríguez de Córdoba and Nancy Crisona for *E. coli* strains.

Author contribution: Jorge Cebrián, Maridán José Kadamatsu, Víctor Martínez, Cristina Parra, Alicia Castán and María-Luisa Martínez-Robles performed the experiments. Pablo Hernández, Dora B. Krimer, María-José Fernández-Nestosa, Christian Schaefer and Jorge B. Schwartzman designed the experiments and interpreted the results. Jorge B. Schwartzman and Andrzej Stasiak wrote the manuscript.

FUNDING

Spanish Ministerio de Economía y Competitividad [BFU2011-22489 to J.B.S.]; Leverhulme Trust [RP2013-K-017 to A.S.]. Funding for open access charge: Spanish

Ministerio de Economía y Competitividad [BFU2011-22489 to J.B.S.]; Leverhulme Trust [RP2013-K-017 to A.S.].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Fernandez,X., Diaz-Ingelmo,O., Martinez-Garcia,B. and Roca,J. (2014) Chromatin regulates DNA torsional energy via topoisomerase II-mediated relaxation of positive supercoils. *EMBO J.*, **33**, 1492–1501.
- Schwartzman,J.B., Martinez-Robles,M.L., Hernandez,P. and Krimer,D.B. (2013) Plasmid DNA topology assayed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.*, **1054**, 121–132.
- Trigueros,S., Arsuaga,J., Vazquez,M.E., Sumners,D.W. and Roca,J. (2001) Novel display of knotted DNA molecules by two-dimensional gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e67.
- Bell,L. and Byers,B. (1983) Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **130**, 527–535.
- Johnson,P.H. and Grossman,L.I. (1977) Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry*, **16**, 4217–4225.
- Oppenheim,A. (1981) Separation of closed circular DNA from linear DNA by electrophoresis in two dimensions in agarose gels. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6805–6812.
- Sundin,O. and Varshavsky,A. (1980) Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell*, **21**, 103–114.
- Sundin,O. and Varshavsky,A. (1981) Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell*, **25**, 659–669.
- Brewer,B.J. and Fangman,W.L. (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, **51**, 463–471.
- Benguria,A., Hernandez,P., Krimer,D.B. and Schwartzman,J.B. (2003) Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 893–898.
- Fierro-Fernandez,M., Hernandez,P., Krimer,D.B. and Schwartzman,J.B. (2007) Replication fork reversal occurs spontaneously after digestion but is constrained in supercoiled domains. *J. Biol. Chem.*, **282**, 18190–18196.
- Santamaria,D., Hernandez,P., Martinez-Robles,M.L., Krimer,D.B. and Schwartzman,J.B. (2000) Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented ColE1 origins. *J. Mol. Biol.*, **300**, 75–82.
- Viguera,E., Hernandez,P., Krimer,D.B., Lurz,R. and Schwartzman,J.B. (2000) Visualisation of plasmid replication intermediates containing reversed forks. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 498–503.
- Brewer,B.J., Sena,E.P. and Fangman,W.L. (1988) Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Cancer Cells*, **6**, 229–234.
- Martin-Parras,L., Lucas,I., Martinez-Robles,M.L., Hernandez,P., Krimer,D.B., Hyrien,O. and Schwartzman,J.B. (1998) Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3424–3432.
- Crisona,N.J., Kanaar,R., Gonzalez,T.N., Zechiedrich,E.L., Klippel,A. and Cozzarelli,N.R. (1994) Processive recombination by wild-type *gin* and enhancer-independent mutant: Insight into the mechanisms of recombination selectivity and strand exchange. *J. Mol. Biol.*, **243**, 437–457.
- Laurie,B., Katritch,V., Sogo,J., Koller,T., Dubochet,J. and Stasiak,A. (1998) Geometry and physics of catenanes applied to the study of DNA replication. *Biophys. J.*, **74**, 2815–2822.
- Stasiak,A., Katrich,V., Bednar,J., Michoud,D. and Dubochet,J. (1996) Electrophoretic mobility of DNA knots. *Nature*, **384**, 122.
- Vologodskii,A.V., Crisona,N.J., Laurie,B., Pieranski,P., Katritch,V., Dubochet,J. and Stasiak,A. (1998) Sedimentation and electrophoretic migration of DNA knots and catenanes. *J. Mol. Biol.*, **278**, 1–3.
- Bates,A.D. and Maxwell,A. (2005) *DNA Topology*. Oxford University Press, Oxford.
- Vologodskii,A. (1992) *Topology and Physics of Circular DNA*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Wang,J. (2009) *Untangling the Double Helix*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Witz,G. and Stasiak,A. (2010) DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 2119–2133.
- Vologodskii,A.V. and Cozzarelli,N.R. (1993) Monte carlo analysis of the conformation of DNA catenanes. *J. Mol. Biol.*, **232**, 1130–1140.
- Olavarrieta,L., Martínez-Robles,M.L., Hernández,P., Krimer,D.B. and Schwartzman,J.B. (2002) Knotting dynamics during DNA replication. *Mol. Microbiol.*, **46**, 699–707.
- Schwartzman,J.B., Martinez-Robles,M.L., Lopez,V., Hernandez,P. and Krimer,D.B. (2012) 2D gels and their third-dimension potential. *Methods*, **57**, 170–178.
- Khodursky,A.B., Zechiedrich,E.L. and Cozzarelli,N.R. (1995) Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 11801–11805.
- Zechiedrich,E.L. and Cozzarelli,N.R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **9**, 2859–2869.
- Lopez,V., Martinez-Robles,M.L., Hernandez,P., Krimer,D.B. and Schwartzman,J.B. (2012) Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3563–3573.
- Santamaria,D., delaCueva,G., Martinez-Robles,M.L., Krimer,D.B., Hernández,P. and Schwartzman,J.B. (1998) DnaB helicase is unable to dissociate RNA-DNA hybrids – Its implication in the polar pausing of replication forks at ColE1 origins. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33386–33396.
- Zechiedrich,E.L., Khodursky,A.B., Bachellier,S., Schneider,R., Chem,D.R., Lilley,D.M.J. and Cozzarelli,N.R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8103–8113.
- Zechiedrich,E.L., Khodursky,A.B. and Cozzarelli,N.R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **11**, 2580–2592.
- Drlica,K. (1999) Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 504–508.
- Martinez-Robles,M.L., Witz,G., Hernandez,P., Schwartzman,J.B., Stasiak,A. and Krimer,D.B. (2009) Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5126–5137.
- Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557–580.
- Adams,D.E., Shekhtman,E.M., Zechiedrich,E.L., Schmid,M.B. and Cozzarelli,N.R. (1992) The role of topoisomerase-IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, **71**, 277–288.
- Kato,J., Nishimura,Y., Imamura,R., Niki,H., Hiraga,S. and Suzuki,H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, **63**, 393–404.
- Olavarrieta,L., Hernández,P., Krimer,D.B. and Schwartzman,J.B. (2002) DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J. Mol. Biol.*, **322**, 1–6.
- Olavarrieta,L., Martinez-Robles,M.L., Sogo,J.M., Stasiak,A., Hernandez,P., Krimer,D.B. and Schwartzman,J.B. (2002) Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 656–666.
- Sogo,J.M., Stasiak,A., Martinez-Robles,M.L., Krimer,D.B., Hernández,P. and Schwartzman,J.B. (1999) Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *J. Mol. Biol.*, **286**, 637–643.
- Viguera,E., Hernández,P., Krimer,D.B., Boistov,A.S., Lurz,R., Alonso,J.C. and Schwartzman,J.B. (1996) The ColE1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22414–22421.
- Weber,C., Carlen,M., Dietler,G., Rawdon,E.J. and Stasiak,A. (2013) Sedimentation of macroscopic rigid knots and its relation to gel electrophoretic mobility of DNA knots. *Sci. Rep.*, **3**, 1091.
- Weber,C., de Los Rios,P., Dietler,G. and Stasiak,A. (2006) Simulations of electrophoretic collisions of DNA knots with gel obstacles. *J. Phys.: Condens. Matter*, **18**, S161–S171.
- Weber,C., Stasiak,A., De Los Rios,P. and Dietler,G. (2006) Numerical simulation of gel electrophoresis of DNA knots in weak and strong electric fields. *Biophys. J.*, **90**, 3100–3105.

45. Vologodskii, A.V. and Cozzarelli, N.R. (1994) Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 609–643.
46. Marko, J.F. (1999) Coupling of intramolecular and intermolecular linkage complexity of two DNAs. *Phys. Rev. E*, **59**, 900–912.
47. Marko, J.F. and Siggia, E.D. (1994) Bending and twisting elasticity of DNA. *Macromolecules*, **27**, 981–988.
48. Vetcher, A.A., McEwen, A.E., Abujarour, R., Hanke, A. and Levene, S.D. (2010) Gel mobilities of linking-number topoisomers and their dependence on DNA helical repeat and elasticity. *Biophys. Chem.*, **148**, 104–111.
49. Zivanovic, Y., Goulet, I. and Prunell, A. (1986) Properties of supercoiled DNA in gel electrophoresis. The V-like dependence of mobility on topological constraint. DNA-matrix interactions. *J. Mol. Biol.*, **192**, 645–660.

Direct Evidence for the Formation of Precatenanes during DNA Replication*

Received for publication, February 2, 2015, and in revised form, March 30, 2015 Published, JBC Papers in Press, March 31, 2015, DOI 10.1074/jbc.M115.642272

Jorge Cebrián^{†1}, Alicia Castán^{†1}, Víctor Martínez[§], Maridian J. Kadomatsu-Hermosa[§], Cristina Parra[§],
María José Fernández-Nestosa[§], Christian Schaerer[§], Pablo Hernández[‡], Dora B. Krimer[‡],
and Jorge B. Schwartzman^{‡2}

From the [†]Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain and the [§]Scientific and Applied Computing Laboratory, Polytechnic School, National University of Asunción, P.O. Box 2111 SL, San Lorenzo, Paraguay

AQ: A

Background: Changes in DNA topology during replication are still poorly understood.

Results: Classical genetics and two-dimensional agarose gel electrophoresis showed that RIs tensioned in the absence of Topo IV.

Conclusion: The results indicated that replication forks swivel *in vivo* leading to the formation of precatenanes as replication progresses.

Significance: This conclusion ends a long lasting debate on the formation of precatenanes during replication.

The dynamics of DNA topology during replication are still poorly understood. Bacterial plasmids are negatively supercoiled. This underwinding facilitates strand separation of the DNA duplex during replication. Leading the replisome, a DNA helicase separates the parental strands that are to be used as templates. This strand separation causes overwinding of the duplex ahead. If this overwinding persists, it would eventually impede fork progression. In bacteria, DNA gyrase and topoisomerase IV act ahead of the fork to keep DNA underwound. However, the processivity of the DNA helicase might overcome DNA gyrase and topoisomerase IV. It was proposed that the overwinding that builds up ahead of the fork could force it to swivel and diffuse this positive supercoiling behind the fork where topoisomerase IV would also act to maintain replicating the DNA underwound. Putative intertwining of sister duplexes in the replicated region are called precatenanes. Fork swiveling and the formation of precatenanes, however, are still questioned. Here, we used classical genetics and high resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis to examine the torsional tension of replication intermediates of three bacterial plasmids with the fork stalled at different sites before termination. The results obtained indicated that precatenanes do form as replication progresses before termination.

(–)-supercoiling is also important for elongation to progress unimpaired (5–7). A complex ensemble of enzymes known as the replisome is responsible for the replication fork to advance. Leading this replisome, a hexameric DNA helicase separates the parental strands that are to be used as templates (8). This strand separation causes overwinding of the duplex ahead of the fork (9–11). If this overwinding persists and accumulates, it would eventually impede fork progression as positive (+)-supercoiling hinders separation of the duplex strands.

In bacteria, DNA gyrase and topoisomerase IV (Topo IV)³ are the main type II DNA topoisomerases involved in the regulation of DNA topology during replication (12, 13). Both enzymes can relax supercoiled DNA molecules. Their mechanism of action, however, differs significantly (14). Topo IV can eliminate both the left-handed crossings of (+)-supercoiling as well as the right-handed crossings of (–)-supercoiling, although it is 20× more efficient doing the former (5, 15). In contrast, DNA gyrase is unique in its ability to introduce (–)-supercoils into covalently closed domains (16). When compared for their ability to remove (+)-supercoils, Topo IV and DNA gyrase eliminate them at roughly the same rate (6). However, Topo IV is 20× more efficient removing left-handed than right-handed crossings (5, 15). In other words, DNA gyrase is 20× more efficient introducing right-handed crossings than Topo IV is at removing them. DNA gyrase plays a critical role in maintaining replicating DNA (–)-supercoil and is essential for replication to proceed. Moreover, in the absence of Topo IV, replication progresses at almost normal rates, but fully replicated duplexes accumulate as catenated rings (5, 17). Despite that a conclusive explanation for the preference of Topo IV for

Changes in DNA topology during replication are still poorly understood. Both *in vivo* (1) and *in vitro* (2) bacterial plasmids are known to be negatively (–)-supercoiled where duplex-duplex crossings adopt a right-handed configuration (Fig. 1A). It is well known that this underwinding facilitates strand separation of the duplex at the origin of replication (3, 4). After initiation,

* This work was supported by Grant BFU2011-22489 from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and European FEDER Funds (to J. B. S.).

[†] Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-837-3112 (Ext. 4232); Fax: 34-91-536-0432; E-mail: schwartzman@cib.csic.es.

³ The abbreviations used are: Topo IV, topoisomerase IV; RH, right-handed; LH, left-handed; CCC, unreplicated covalently closed circle; OC, unreplicated open circle; CCRl, covalently closed replication intermediate; OCRI, open circle replication intermediate; L, linear form; CatA, catenane where both rings are nicked; CatB, catenanes where one ring is nicked and the other covalently closed; CatC, catenane where both rings are covalently closed.

F1

DNA Topology during Replication

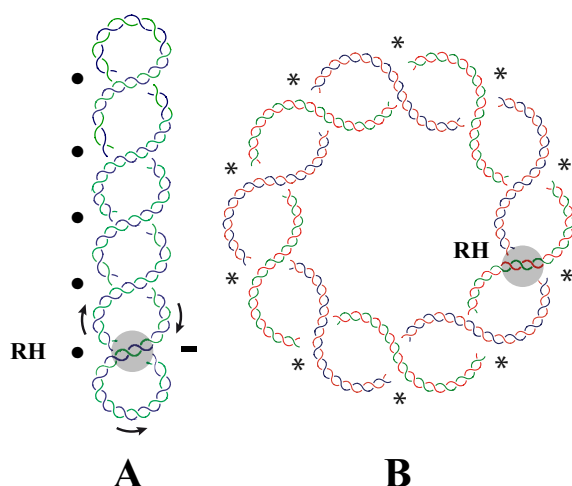


FIGURE 1. Schematics illustrating a covalently closed and supercoiled molecule and two nicked molecules heavily intertwined. Note that the covalently closed molecule is negatively supercoiled (A) where all the crossings are RH. In the catenated rings showed to the right (B), the duplexes intertwine in an RH manner, too. In the covalently closed molecule, the DNA duplex is depicted in blue and green, and the catenated duplexes are depicted in blue and red and green and red, respectively, indicating that they are the natural products of replication where the newly synthesized strands are depicted in red. Full black dots indicate the intramolecular nodes of the supercoiled form. Asterisks indicate the intermolecular nodes of the catenane.

left-handed crossings is still debated, there is general agreement that differences in the geometry of the crossings must play a major role (5, 8, 15, 18–23). DNA gyrase and Topo IV acting together ahead of the fork could be sufficient for replication to be completed. However, the processivity of helicase generating (+)-supercoiling might overcome DNA gyrase and Topo IV in their attempt to keep unreplicating DNA underwound. This potential problem was first recognized by Champoux and Been (24), who proposed that the (+)-supercoiling that transiently accumulates ahead of the fork could force it to swivel to diffuse this (+)-supercoiling behind the fork where Topo IV, the main decatenase in *Escherichia coli* (14, 25), would help to maintain the DNA of replicating molecules underwound. The foundations to analyze the structure of replication intermediates *in vivo* were established in the Cozzarelli and Marians laboratories in the late nineties of the last century. They called the putative intertwines of sister duplexes in the replicated region “precatenanes” to distinguish them from the supercoils of the unreplicated region (10, 11). Formation of precatenanes as replication progresses *in vivo*, however, is still questioned because if the replisome is anchored to the cell membrane, it would not be able to swivel (17, 19, 26–28). In any case, it is well known that in the absence of Topo IV fully replicated duplexes accumulate as catenated rings (17, 29). These rings intertwine in a right-handed manner (Fig. 1B). It should be noted, though, that once DNA is isolated and all proteins are removed, the forks have no impediment to rotate freely *in vitro*, and this rotation allows diffusion of the torsional tension from the replicated to the unreplicated regions and vice versa to achieve thermodynamic equilibrium (11). This redistribution of torsional tension occurs in such a way that the left-handed supercoils of the unreplicated

region switch to right-handed precatenanes when diffused to the replicated region and vice versa. In other words, the naked DNA examined *in vitro* does not necessarily reflect the situation *in vivo*. We are only allowed to inspect naked DNA from equilibrated replication intermediates (RIs) but ignore whether or not their geometry changes due to deproteinization. In summary, one of the most puzzling uncertainties regarding the dynamics of DNA topology during replication concerns whether or not forks can swivel *in vivo* leading to the formation of precatenanes as the replication fork advances (10, 19, 30). In an attempt to shed new light on this issue, we used classical genetics and high resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis to examine the RIs of the following three bacterial plasmids, pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII, and pBR-TerE@DraI (29), isolated from *E. coli* strains with different combinations of topoisomerases. In most cases for these three plasmids, the replicating fork stalls as it reaches the TerE-TUS complex (31, 32). This blockage leads to the accumulation of partially replicated molecules with a mass $\sim 1.2\times$, $\sim 1.6\times$, and $\sim 1.8\times$ the mass of unreplicated molecules (Fig. 3).

The first possibility indicates that forks do not swivel during replication. This hypothesis precludes the formation of precatenanes during replication. In the case of unimpaired replication, fully replicated molecules would end up catenated in a right-handed manner solely due to the linking of the last ~ 200 bp of DNA for which it would not be possible for DNA gyrase and Topo IV to remove the links ahead of the replication fork at termination (6, 17).

According to this hypothesis, if RIs with the fork stalled at the Ter-TUS complex were isolated from bacterial cells where Topo IV is active, molecules with the fork stalled would be (–)-supercoiled (showing right-handed crossings) in the unreplicated region and devoid of precatenanes (Fig. 2A). After deproteinization, though, some of the right-handed crossings of the unreplicated region would diffuse to the replicated one as left-handed precatenanes to equilibrate the torsional tension between unreplicated and replicated regions. In consequence, after deproteinization, these RIs would have right-handed crossings in the unreplicated region and left-handed precatenanes (Fig. 2B).

If RIs were isolated from cells where Topo IV is inactive, molecules would be (–)-supercoiled (showing right-handed crossings) in the unreplicated region and also devoid of precatenanes. As in the previous case, after deproteinization some of the (–)-supercoils of the unreplicated region would diffuse to the replicated one as left-handed precatenanes. In other words, if replication forks cannot rotate *in vivo*, partially replicated molecules with the fork stalled will look alike after deproteinization regardless of whether they were isolated from Topo IV-proficient or -deficient cells. The degree of torsional tension, however, would vary depending on the length of the region that remained unreplicated after fork stalling (Fig. 3). This region

would represent only $\sim 20\%$ of the RIs for pBR-TerE@DraI (full size ~ 7.98 kb), $\sim 40\%$ for pBR-TerE@AatII (full size 7.12 kb), and $\sim 80\%$ for pBR-TerE@StyI (full size 5.52 kb).

In summary, if the forks were not allowed to swivel during replication, the shorter RIs’ unreplicated region, DNA gyrase, would have less space to introduce right-handed crossings. This

DNA Topology during Replication

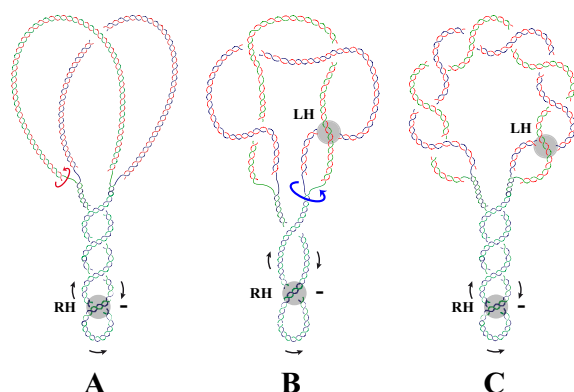


FIGURE 2. Schematics illustrating three partially replicated molecules. A, if the forks cannot swivel *in vivo*, the unreplicated region would be negatively supercoiled showing RH crossings. The replicated region would be relaxed as the nascent strands of the sister duplexes are discontinuous and may rotate around its parental strand (red arrow) to dissipate any torsional tension. B, after deproteinization, the forks are allowed to rotate (blue arrow) freely to achieve thermodynamic equilibrium. Some of the RH crossings of the unreplicated region in A will diffuse to the replicated region where they will adopt the form of LH precatenanes. As the crossings in the unreplicated region contain both strands of the duplex, whereas in the replicated region the crossings contain one continuous parental strand and one discontinuous nascent strand, each crossing in the unreplicated region corresponds to two precatenane crossings. C, if the forks can swivel *in vivo*, partially replicated molecules would be saturated with negative supercoiling (showing RH crossings) in the unreplicated region and heavily intertwined (showing LH crossings) in the replicated region.

torsional tension introduced by DNA gyrase *in vivo* once the replication fork has stalled at the Ter-TUS complex would redistribute among the unreplicated and replicated regions only after deproteinization. For this reason, pBR-TerE@StyI RIs would show the highest degree of torsional tension and pBR-TerE@DraI the lowest. The important point here is that this would occur regardless of whether Topo IV was active or inactive *in vivo*.

The second possibility indicates that forks do swivel during replication. If true, forks would rotate clockwise or counter-clockwise depending on the nature and degree of torsional tension ahead and behind the fork. If replication progresses unimpaired in a bacterial strain where Topo IV is active, (+)-supercoiling would continuously accumulate immediately ahead of the fork but only transiently. This local positive torsional tension would force the fork to rotate in such a way to diffuse these (+)-supercoils to the replicated region as right-handed precatenanes (10, 11, 24). Topo IV would progressively remove these precatenanes. Upon stalling the replication fork, though, no more (+)-supercoiling would form ahead of the fork, and molecules would tend to equilibrate the torsional tension between unreplicated and replicated regions already *in vivo*. As mentioned previously, DNA gyrase is $\sim 20\times$ more efficient introducing right-handed crossings than Topo IV is in removing them (5, 6, 15). For this reason, shortly after fork stalling, the unreplicated region would become saturated with (–)-supercoiling. DNA gyrase would keep introducing (–)-supercoils in the unreplicated region, and to keep the torsional tension equilibrated, these right-handed crossings from the unreplicated region would diffuse to the replicated one as left-

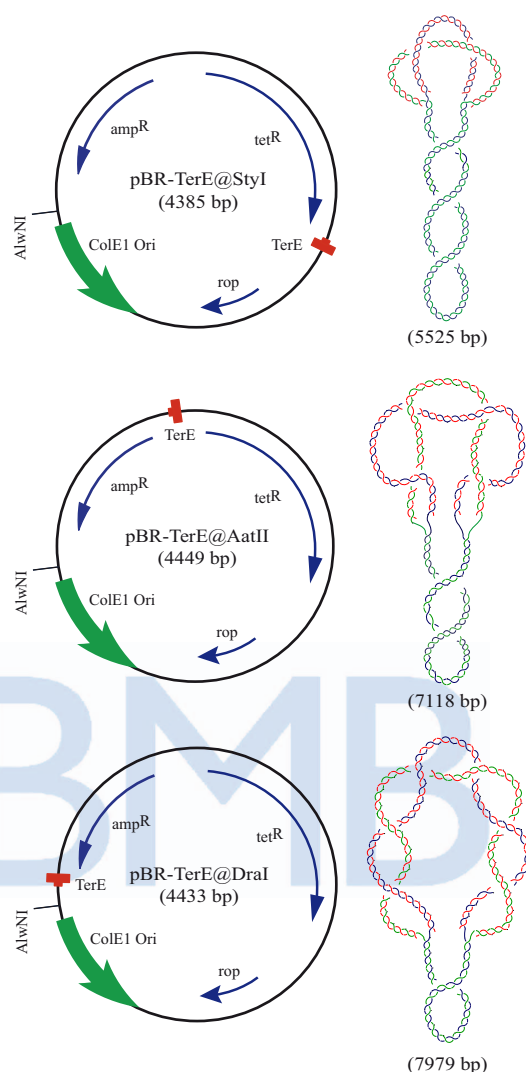


FIGURE 3. Genetic maps and cartoons illustrating the three plasmids used in this study: pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII, and pBR-TerE@DraI. The genetic maps show the name and mass of each plasmid. Inside, each map shows the relative position of its most relevant features as follows: the ColE1 unidirectional origin in green (ColE1 Ori); the *E. coli* terminator sequence in red (TerE); and the *rop* gene and the ampicillin and tetracycline resistance genes in blue (*ampR* and *tetR*). Outside, the relative position of the site recognized by AlwNI is indicated. To the right of the maps, schematics illustrate the partially replicated molecules with their corresponding masses. For comparison, all of them were drawn with a $\Delta Lk = -4$.

handed precatenanes, where Topo IV would progressively remove them (see Fig. 2C). It should be noted that Topo IV is thought to remove left-handed crossings as efficiently as DNA gyrase introduces (–)-supercoiling (6, 33). This detrimental tug-of-war between DNA gyrase and Topo IV would start as soon as the replicating fork stalls at the Ter-E-TUS complex and would likely continue until cell harvest. In consequence, partially replicated molecules isolated from Topo IV-proficient cells would be neither saturated with (–)-supercoiling in the

DNA Topology during Replication

unreplicated region nor heavily precatenated in the replicated one.

Note that for ColE1 plasmids in *E. coli* cells, there are 20–40 copies per cell, and this copy number is stringently regulated (34, 35). Moreover, stalling of the replication fork at the TerE-TUS complex only occurs in ~80% of the cases. In the remaining ~20% (~5 plasmids per cell), the replicating fork goes by TerE unimpaired probably due to a failure in the formation of a stable TerE-TUS complex (36, 37). In these plasmids, replication is completed and segregation follows provided Topo IV is active. This small but consistent number of plasmids carrying the β -lactamase gene allows the cells to survive in the presence of ampicillin. In cells where Topo IV is inactive, however, although ~20% of the plasmids complete replication, the sister duplexes fail to segregate and catenanes accumulate (17, 29). As mechanical nicking is unavoidable during DNA isolation, these catenanes are detected in three different forms as follows: catenanes where both rings are nicked (CatAs); catenanes where one ring is nicked and the other covalently closed (CatBs); and catenanes where both rings are covalently closed (CatCs) (17, 29, 38, 39) together with partially replicated molecules.

If RIs were isolated from cells where Topo IV is inactive *in vivo*, upon fork stalling at the TerE-TUS complex, no more (+)-supercoiling would form ahead of the fork. DNA gyrase, though, would keep introducing right-handed supercoils in the unreplicated region. As here we consider that forks do rotate *in vivo*, the right-handed crossings introduced by DNA gyrase in the unreplicated region would continuously diffuse to the replicated one as left-handed precatenanes. Here, however, Topo IV would not remove them. In consequence, these RIs would end up saturated with (–)-supercoiling in the unreplicated region and heavily precatenated (showing left-handed crossings) in the replicated one. In other words, if forks swivel *in vivo*, the RIs of the three plasmids isolated from Topo IV-proficient cells would be poorly torsioned as compared with those isolated from Topo IV-deficient cells. In both cases, though, the composition of the torsional tension would be different for the three plasmids. It would mainly include (–)-supercoiling for pBR-TerE@StyI and predominantly left-handed precatenanes for pBR-TerE@DraI (see Fig. 3).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains, Plasmids, and Culture Medium—The *E. coli* strains used in this study were DH5 α F' {F'/gyrA96(Nal^r) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$) glnV44 deoR Δ (lacZYA-argF)U169[F80d Δ (lacZ)M15]}, W3110 {F[–], SD108 [Δ (topA-cysB)204 acrA13 gyrB225 topA⁺ transduced]} and parE10 {W3110 except [parE10 recA]}. Competent cells were transformed with monomeric forms of pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII, or pBR-TerE@DraI and all derivatives of pBR322 with the polar replication terminator TerE (31, 32) cloned at variable distances from the unidirectional ColE1 origin as described before (29). DH5 α F' cells were grown in LB medium at 37 °C, and parE10 cells were grown at the restrictive temperature (43 °C). In all cases, 75 μ g/ml ampicillin was added to the LB medium. Isolation of plasmid DNA was performed as described elsewhere (40–42).

Two-dimensional Agarose Gel Electrophoresis and Southern Transfer—The first dimension was in a 0.4% agarose (Seakem®LE, Lonza) gel in TBE buffer (89 mM Tris borate, 2 mM EDTA) at 0.9 V/cm at room temperature for 25 h. The second dimension was in a 1% agarose gel in TBE buffer and was run perpendicular to the first dimension. The dissolved agarose was poured around the excised agarose lane from the first dimension, and electrophoresis was at 5 V/cm in a 4 °C cold chamber for 10 h. When necessary, 5 μ g/ml chloroquine (Sigma) was added to the TBE buffer in both the agarose gel and the running buffer in the second dimension. Southern transfer was performed as described before (40–42).

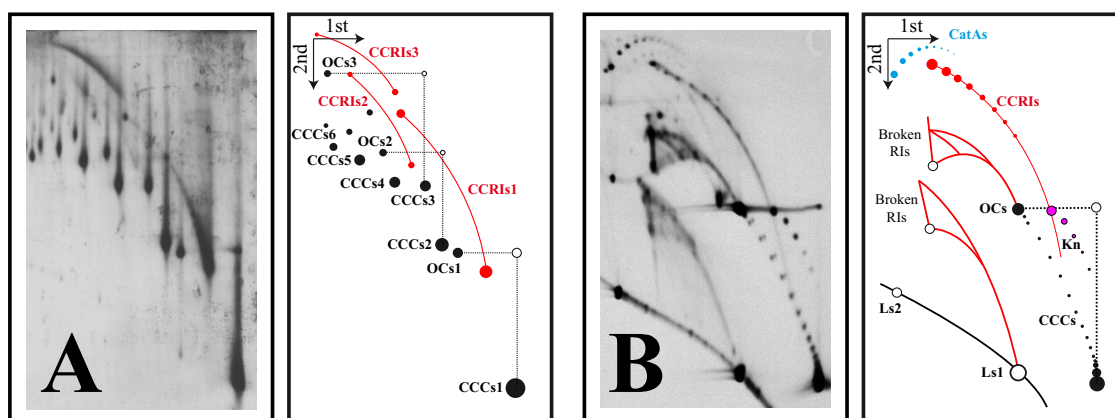
Nonradioactive Hybridization—DNA probes were labeled with digoxigenin using the DIG-High Prime kit (Roche Applied Science). Membranes (nylon membranes, positively charged, Roche Applied Science) were prehybridized in a 20-ml prehybridization solution (2 $\times$ SSPE, 0.5% Blotto, 1% SDS, 10% dextran sulfate, and 0.5 mg/ml sonicated and denatured salmon sperm DNA) at 65 °C for 4–6 h. Labeled DNA was added, and the hybridization lasted for 12–16 h. Hybridized membranes were sequentially washed with 2 $\times$ SSC and 0.1% SDS at room temperature for 5 min twice and with 0.1 $\times$ SSC and 0.1% SDS at 68 °C for 15 min twice as well. Detection was performed with an antidigoxigenin-alkaline phosphatase-conjugated antibody (Roche Applied Science) and CDP-Star (PerkinElmer Life Sciences) according to the instructions provided by the manufacturer. All experiments were performed twice to confirm the results obtained were reproducible.

Densitometry—Autoradiograms were scanned, and the region where unknotted and knotted RIs migrated was analyzed by densitometry using Image J64 (National Institutes of Health) to determine the ratio of knotted to unknotted molecules (29, 43).

RESULTS

Our primary aim was to inhibit Topo IV without affecting DNA gyrase. For this reason, we first chose *E. coli* DH5 α F' cells as they bear the mutation *gyrA96* that turns these cells resistant to derivatives of nalidixic acid (25, 44). Indeed, cells of this strain exposed to norfloxacin have been successfully used before to accumulate catenanes without affecting DNA gyrase (17, 45). In addition, DH5 α F' cells are RecA[–] avoiding the formation of multimers (46, 47). The convenience to use a RecA[–] strain is clearly illustrated in Fig. 4A. pBR-TerE@AatII was used to transform W3110 cells that are RecA⁺. The combined detection of unreplicated and partially replicated forms of monomers and multimers, *i.e.* dimers, trimers, and so on, makes it difficult to identify the signals of interest. However, we found that molecules containing stalled forks tend to break in the presence of norfloxacin (Fig. 4B). The signals marked as “Broken RIs” are indicative of RIs broken at the forks (48, 49). For this reason, to inhibit Topo IV without affecting DNA gyrase we switched to parE10 cells that bear a Topo IV^{ts} mutation (25, 26, 44). To check whether the topology of bacterial plasmids was somehow affected in DH5 α F' cells in the absence of norfloxacin compared with a wild-type strain, we determined the supercoiling density (σ) of unreplicated forms of pBR-TerE@AatII isolated from either DH5 α F' cells that are RecA[–],

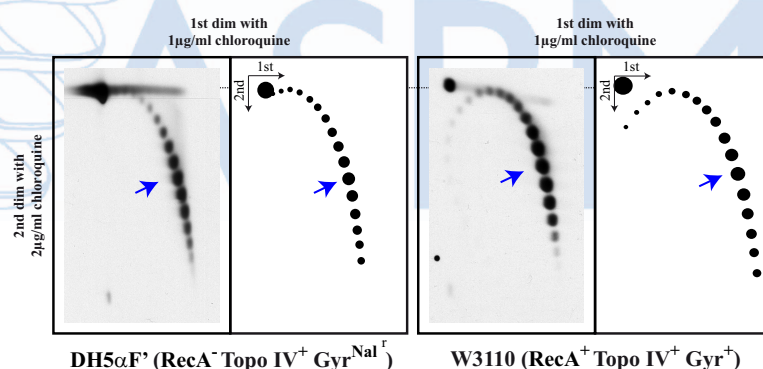
DNA Topology during Replication



W3110 (RecA^+ Topo IV^+ Gyr^+)

DH5 α F' (RecA^- Topo IV^+ $\text{Gyr}^{\text{Nal}^r}$)
15 μ M norfloxacin 15 min

FIGURE 4. Immunograms of intact forms of pBR-TerE@AatII isolated from either *E. coli* W3110 or DH5 α F' cells (exposed to norfloxacin) analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. A, W3110 cells are RecA^+ , Topo IV^+ , and Gyr^+ (44). B, DH5 α F' cells are RecA^- and Topo IV^+ and bear the *gyrA96* mutation that turns these cells resistant to derivatives of nalidixic acid. DH5 α F' were grown until the culture achieved logarithmic growth and were then exposed to 15 μ M norfloxacin for the last 15 min. To the right of each immunogram is an interpretative diagram of the most relevant features where unreplicated CCCs and OCs are depicted in black. CCRIs are depicted in red. Numbers refer to monomers (1) and multimers: dimers (2), trimers (3), etc. Broken RIs are indicated (48, 49).



DH5 α F' (RecA^- Topo IV^+ $\text{Gyr}^{\text{Nal}^r}$)

W3110 (RecA^+ Topo IV^+ Gyr^+)

FIGURE 5. Unreplicated forms of pBR-TerE@AatII isolated from either DH5 α F' or W3110 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. Representative immunograms of two-dimensional gels show where the first and second dimensions occurred in the presence of different concentrations of chloroquine to resolve all the population of topoisomers. The first dimension occurred in the presence of 1 μ g/ml, and the second dimension was in the presence of 2 μ g/ml chloroquine. The most abundant topoisomer is indicated with a blue arrow. In both cases, the supercoiling density was -0.065 (modal $\Delta Lk = -27$).

F5

Topo IV^+ , and *gyrA96* or W3110 cells that are RecA^+ , Topo IV^+ , and Gyr^+ . The results obtained are shown in Fig. 5. In both cases σ was -0.065 (modal $\Delta Lk = -27$). Therefore, in the experiments that follow, in order to determine the torsional tension of RIs in the presence and absence of Topo IV , we decided to use DH5 α F' cells and parE10 cells exposed to the restrictive temperature for the last hour.

We transformed both cell strains with the bacterial plasmids pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII, and pBR-TerE@DraI, cultured the cells until they achieved logarithmic growth, and isolated the DNA from either *E. coli* DH5 α F' cells (where Topo IV is active) or parE10 cells grown for the last 1 h at the restrictive temperature (where Topo IV is inactive). High resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis and DNA hybridiza-

tion with appropriate probes were used to examine intact RIs of the three plasmids.

The results obtained are shown in Fig. 6. All the immunograms were aligned attending to the mobility of OCs. Note that chloroquine's intercalation has no effect on the electrophoretic mobility of nicked unreplicated molecules (29, 37, 50).

The electrophoretic mobility of unreplicated forms of all three plasmids isolated from DH5 α F' cells analyzed without chloroquine was the same as expected for molecules almost identical in mass and shape as follows: 4385 bp for pBR-TerE@StyI; 4449 bp for pBR-TerE@AatII; and 4433 bp for pBR-TerE@DraI (left column in Fig. 6). The only significant difference among pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII, and pBR-TerE@DraI is the location of TerE (Fig. 3). For this reason, the

F6

DNA Topology during Replication

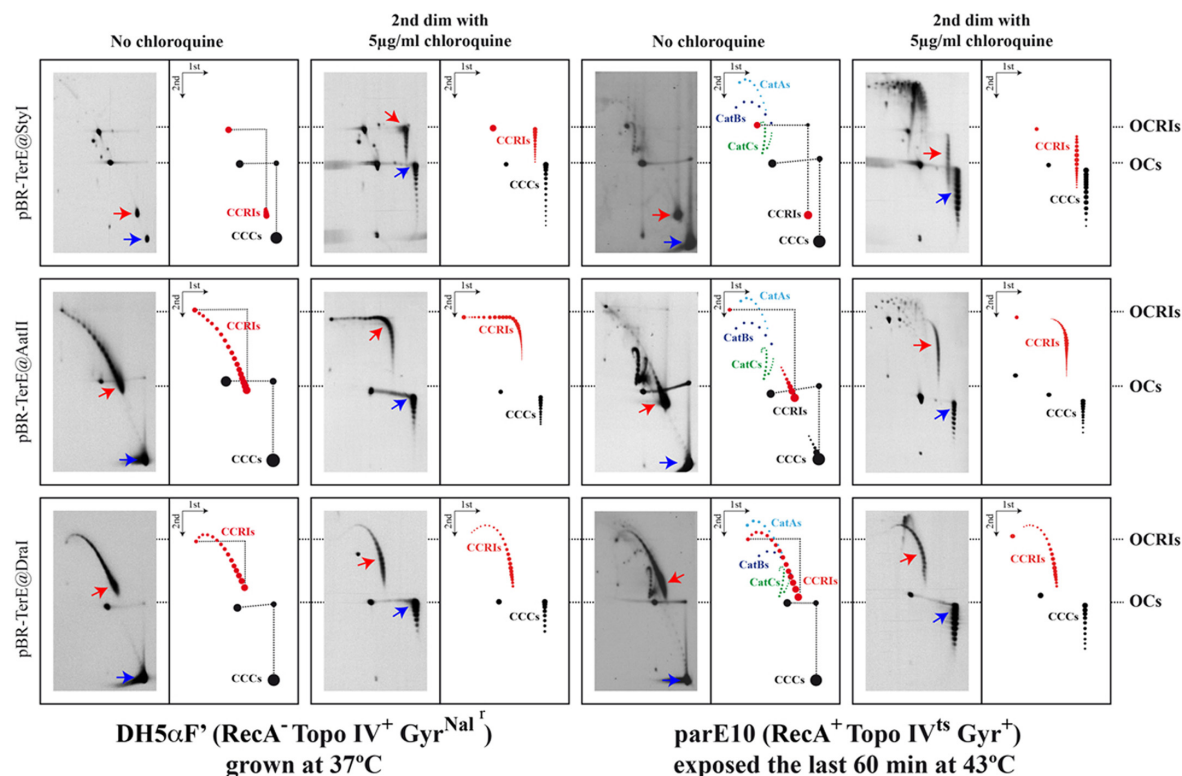


FIGURE 6. Immunograms of intact forms of the three plasmids isolated from either DH5αF' or parE10 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. Two-dimensional gels where the second dimension occurred in the presence of 5 μg/ml chloroquine are indicated on top. To the right of each immunogram is an interpretative diagram of the most relevant features where CCRIs are depicted in red. Where it applies, CatAs (in light blue), CatBs (in dark blue), and CatCs (in green) are also shown. All immunograms were aligned according to the electrophoretic mobility of nicked monomers (OCs) and nicked replication intermediates (OCRIs) that are not affected by chloroquine. Blue arrows point to the most abundant topoisomer of unreplicated forms, and red arrows point to the most abundant CCRi in all cases.

electrophoretic mobility of nicked RIs (OCRIs) varied for the three plasmids, as their masses were 5525 bp for pBR-TerE@StyI, 7118 bp for pBR-TerE@AatII, and 7979 bp for pBR-TerE@DraI, respectively. Note that the CCRIs, depicted in red in the interpretative diagrams, appeared as just a few topoisomers with an electrophoretic mobility during the second dimension close to the mobility of unreplicated CCCs for pBR-TerE@StyI. For pBR-TerE@AatII, CCRIs appeared as an arc formed by a series of topoisomers that extended from a spot with electrophoretic mobility during the second dimension, slightly higher than unreplicated OCs up to OCRIs. Finally, for pBR-TerE@DraI, CCRIs also appeared as an arc formed by a series of topoisomers that extended from a spot with electrophoretic mobility during the second dimension, slightly lower than unreplicated OCs up to OCRIs as well. In this case, however, the arc of RI topoisomers showed an inflection for the last poorly torsioned molecules.

The electrophoretic mobility of unreplicated forms of all three plasmids isolated from parE10 cells analyzed without chloroquine showed no difference when compared with the DNA isolated from DH5αF' cells. In these immunograms, though, fully replicated catenanes (CatAs, CatBs, and CatCs) were clearly visible (next to the right column in Fig. 6). As men-

tioned previously, in the absence of Topo IV, ~20% of the plasmids escape the TerE/TUS replication blockage and complete replication, but the sister duplexes fail to segregate and catenanes accumulate (17, 29). No significant difference was observed for CCRIs isolated from parE10 cells as compared with the immunograms of DNA isolated from DH5αF' cells in the case of pBR-TerE@StyI and pBR-TerE@DraI. However, the pattern of the arc corresponding to CCRIs (depicted in red in the interpretative diagram) for pBR-TerE@AatII was significantly different. Although in both cases the majority of RI topoisomers showed the fastest electrophoretic mobility discernable, just a few topoisomers showing lower electrophoretic mobilities during the second dimension could be detected for the RIs isolated from parE10 cells. On the contrary, in the case of DNA isolated from DH5αF' cells, the arc of CCRIs was almost complete. This observation strongly suggested that at least for pBR-TerE@AatII, CCRIs isolated from parE10 cells (where Topo IV is inactive) were more torsionally tensioned than those isolated from DH5αF' cells (where Topo IV is active).

In an attempt to compare the torsional tension of these RIs isolated from different cell strains in a different way, 5 μg/ml chloroquine was added only during the second dimension of

DNA Topology during Replication

the two-dimensional gel system. Chloroquine is a planar molecule that intercalates between the two strands of the DNA double helix. This intercalation changes DNA twist. As bacterial plasmids are (–)-supercoiled, chloroquine removes (–)-supercoiling first and adds net (+)-supercoiling only after all native (–)-supercoiling has been removed (37, 51). Moreover, it was repeatedly shown that in partially replicated molecules containing three-way forks, overwinding of the unreplicated region transforms three-way into four-way junctions called reversed forks or chicken feet (37, 50–53). Molecules with these four-way junctions where the fourth arm varies in length are not (+)-supercoiled and show the same electrophoretic mobility as nicked RIs.

As mentioned previously, only chloroquine intercalation in the unreplicated region of the RIs is expected to affect DNA topology. For this reason, it would have a profound effect on pBR-TerE@StyI but not on pBR-TerE@DraI (29, 37). We chose 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine as we knew that for pBR322 with a $\Delta Lk = 0$, this concentration introduces ~ 23 (+)-supercoils.⁴ Indeed, the results obtained confirmed our expectations. For the three plasmids isolated from DH5 α F' cells, the effect of chloroquine's intercalation on unreplicated molecules was alike (next to *left column* in Fig. 6). The effect on the shape of the arc corresponding to partially replicated molecules, however, differed for the three plasmids. For pBR-TerE@StyI, the electrophoretic mobility of CCRIs during the second dimension in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine changed in a way similar to the change observed for unreplicated CCCs. Taking into account that CCRIs cannot re-gain mobility after the removal of all their native (–)-supercoiling (37, 50), we may conclude that in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine the modal topoisomer for pBR-TerE@StyI CCRIs was close to 0 (indicated by the corresponding *red arrow* in Fig. 6). For pBR-TerE@AatII, the arc of CCRIs changed its shape dramatically. It described a smooth arc without chloroquine. This arc, though, turned into an acute angle in the presence of chloroquine during the second dimension. In this case the modal topoisomer was –3 (indicated by the corresponding *red arrow* in Fig. 6). For pBR-TerE@DraI, however, the change in the shape of the arc was subtle. If we compare these results with those obtained for the same three plasmids isolated from parE10 cells, the differences were obvious (see the *right column* on Fig. 6). pBR-TerE@StyI CCRIs were not fully relaxed, and the majority of the molecules still showed an electrophoretic mobility higher than their corresponding OCRIs. The modal topoisomer in this case was –4 (indicated by the corresponding *red arrow* in Fig. 6). This means that for pBR-TerE@StyI CCRIs isolated from parE10 cells, exposure to 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine during the second dimension was not enough to remove all the torsional tension. For pBR-TerE@AatII, the shape of the arc of CCRIs was not as abrupt as in the case of the molecules isolated from DH5 α F' cells. Indeed, here most of the CCRIs were still torsionally tensioned and the modal topoisomer was –11 still showing an electrophoretic mobility significantly higher than their corresponding OCRIs (indicated by the corresponding *red arrow* in

Fig. 6). For pBR-TerE@DraI, however, the change in the shape of the arc was once again only subtle (the modal topoisomer was –13 for DH5 α F' versus –12 for parE10). Altogether, these observations indicated that 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine added during the second dimension affected the mobility of CCRIs differently. The results obtained confirmed that CCRIs isolated from parE10 cells were more torsionally tensioned than those isolated from DH5 α F' cells. The effect of chloroquine was notable for pBR-TerE@StyI, less apparent for pBR-TerE@AatII, and almost negligible for pBR-TerE@DraI. Unreplicated plasmids isolated from cells where Topo IV is inactive are slightly more (–)-supercoiled than those isolated from cells where Topo IV is active (44, 54). As mentioned previously, here we used the RecA[–] DH5 α F' cells to avoid the formation of multimers due to recombination.

It was recently shown that torsional tension reduces the probability for Topo IV to create replication knots (29, 55–58). In contrast, it is well known that the level of DNA knotting is proportional to molecular mass (40, 59). To further confirm the results obtained so far, we decided to measure DNA knotting in the replicated region of the RIs isolated from DH5 α F' and parE10 cells. We anticipated that the number and complexity of replication knots would be higher for pBR-TerE@DraI and lower for pBR-TerE@StyI. To facilitate the quantitation of replication knots, we digested the RIs of the three plasmids with AlwNI. This restriction enzyme cuts the plasmids only once at the unreplicated region (see Fig. 3). The resulting digested molecules consisted of linear DNAs containing an internal bubble. These molecules were analyzed in two-dimensional gels allowing the identification of unknotted and knotted forms after hybridization with proper probes. Finally, the signals corresponding to unknotted versus knotted molecules were quantitated by densitometry (29, 43). The results obtained confirmed our expectations (Fig. 7). For both cell strains (DH5 α F' and parE10) the percentage of knotted bubbles increased with the size of the bubble (40). This observation suggests that torsional tension was higher for those CCRIs isolated from parE10 cells (29, 55–58).

DISCUSSION

Formation of precatenanes as replication progresses has been discussed before (6, 8, 10, 19, 30, 33). However, the issue remains unsettled. Fully replicated molecules may become catenated just at the very end of replication before termination due to the linking of the last ~ 200 bp of DNA for which it would not be possible for DNA gyrase and Topo IV to remove the links ahead of the replication forks (6, 17, 38). However, the three major experimental observations supporting the formation of precatenanes as replication progresses are as follows: the excess of positive windings as a function of the extent of replication *in vitro* (6); the occurrence of knotted replication bubbles in bacterial plasmids (29, 37, 40, 43, 60, 61); and the detection of σ -shaped replication intermediates in *Xenopus* extracts after poisoning Topo II with etoposide and the purification by virtue of their covalent attachment to Topo II subunits (48).

Here, we obtained additional experimental evidence supporting the formation of precatenanes during the replication of bacterial plasmids. It is important to emphasize, however, that

⁴ J. B. Schwartzman, unpublished results.

DNA Topology during Replication

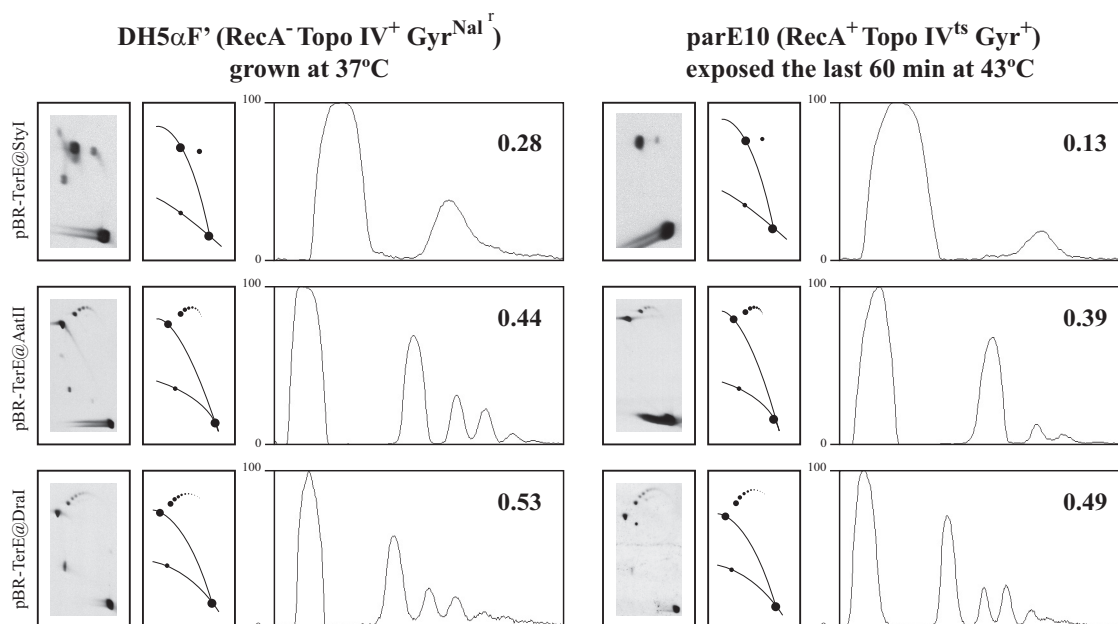


FIGURE 7. Comparison of knotted and unknotted RIs of the three plasmids isolated from either DH5αF' or parE10 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. DNA was isolated, digested with AlwNI, and analyzed in two-dimensional gels. The area of the immunogram where unknotted and knotted RIs migrated was scanned and analyzed by densitometry. In each case, immunograms are shown to the left, diagrammatic interpretations are in the middle, and densitometric profiles are to the right. The numbers at the top right corner of each profile indicate the ratio of knotted/unknotted molecules. Note that for both cell types, this ratio was higher for pBR-TerE@DraI. For each plasmid, however, the ratio was always higher for the RIs isolated from DH5αF' cells.

small bacterial plasmids are tiny topological domains significantly different from the big loops or compartments of prokaryotic and eukaryotic chromosomes (55, 62). Therefore, extrapolation of the results obtained with bacterial plasmids to bigger and more complex chromosomes should only be made with special care.

The results obtained here indicate that RIs isolated from parE10 cells grown for the last hour at the restrictive temperature (where Topo IV is inactive) were more torsionally tensioned than the same RIs isolated from DH5αF' cells (where Topo IV is active). This observation was based on the electrophoretic mobility of the partially replicated molecules. As clearly observed by comparing the patterns of pBR-TerE@AatII RIs analyzed in two-dimensional gels with no chloroquine (see Fig. 6), the electrophoretic mobility of these RIs was unambiguously displaced toward highly torsioned topoisomers in the case of molecules isolated from parE10 cells. As discussed above, this was expected provided the replication forks swivel *in vivo* during replication. This observation was not obvious for the other two plasmids, pBR-TerE@StyI and pBR-TerE@DraI. In these cases there was no significant difference in the distribution and intensity of the signals corresponding to RIs. As illustrated in Fig. 3, for pBR-TerE@StyI the majority of the crossings are expected to be supercoils in the unreplicated region that contains ~80% of the molecule. For the same ΔLk , the electrophoretic mobility of catenanes would be roughly half that of supercoils (10, 63). These RIs migrated very close to unreplicated CCCs (see Fig. 6). For pBR-TerE@DraI, however,

most of the crossings are expected to be precatenanes in the replicated region because the unreplicated region contains just ~20% of the molecule. Huge differences of torsional tension would be needed to significantly change the electrophoretic mobility in these two cases. On the contrary, for the RIs of pBR-TerE@AatII, approximately half of the molecule remained unreplicated, although the other half was replicated (see Fig. 3). For this reason, even subtle changes in torsional tension have an immediate reflection in electrophoretic mobility. We wanted to confirm this observation and used 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine during the second dimension of the two-dimensional gel system. Chloroquine's intercalation in the sister duplexes of the replicated region has no effect on the writhing because the nascent strands are already discontinuous (8). Only chloroquine's intercalation in the unreplicated region of the RIs induces relevant changes in writhing. As for pBR-TerE@DraI, the unreplicated region contains only ~20% of the molecule, and here the effect of chloroquine's intercalation is expected to be negligible. The results obtained matched this prediction precisely. Moreover, for pBR-TerE@StyI, the differences between RIs isolated from DH5αF' and parE10 cells observed in electrophoretic mobility after chloroquine's intercalation revealed that although not evidenced without chloroquine, the RIs isolated from parE10 cells were clearly more torsionally tensioned (see Fig. 6). Chloroquine's intercalation completely relaxed a significant number of CCRIs in the case of molecules isolated from DH5αF' cells, whereas those isolated from parE10 cells still retained significant electrophoretic mobility. A similar observation was evi-

DNA Topology during Replication

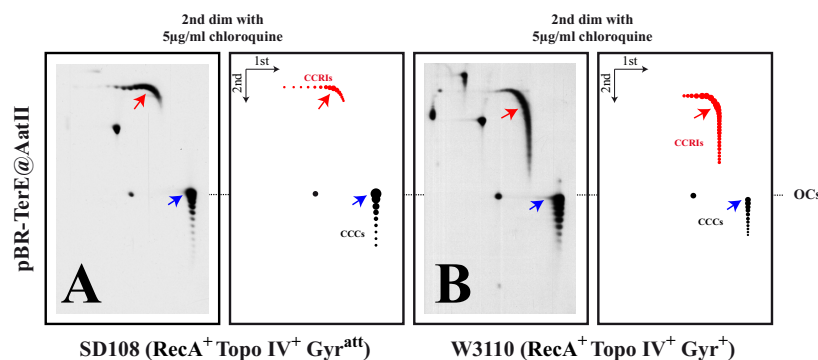


FIGURE 8. Immunograms of intact forms of pBR-TerE@AatII isolated from SD108 or W3110 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis where the second dimension occurred in the presence of 5 μ g/ml chloroquine. A, SD108 cells bear the mutation *gyrB225* that turns the DNA gyrase ineffectively (72). B, W3110 cells are RecA⁺, Topo IV⁺, and Gyr⁺ (44). In both cases, the second dimension of the two-dimensional gels occurred in the presence of 5 μ g/ml chloroquine. To the right of each immunogram, an interpretative diagram of the most relevant features where unreplicated CCCs and open circles (OCs) are depicted in black. Intact replication intermediates (CCRIs) are depicted in red. The immunograms were aligned according to the electrophoretic mobility of nicked unreplicated monomers (OCs) that are not affected by chloroquine. Red arrows point to the most abundant CCRl topoisomer, and blue arrows point to the most abundant topoisomer of unreplicated forms (CCCs).

dent for pBR-TerE@AatII (Fig. 6). As mentioned previously, it should be noticed that for RIs containing three-way junctions, once all the native (–)-supercoiling is removed, these molecules cannot acquire (+)-supercoiling because the nascent strands of the sister duplexes form a fourth arm leading to fork reversal with changes in neither mass nor electrophoretic mobility (50, 51). Finally, the number and complexity of replication knots were higher for the RIs isolated from DH5 α F' cells, also suggesting that the degree of precatenation was higher for the RIs isolated from parE10 cells (see Fig. 7 and Ref. 29).

It could be argued that CCRIs isolated from DH5 α F' cells (where Topo IV is active) were less torsionally tensioned due to the removal of right-handed crossings by Topo IV in the unreplicated region. For this to be true, the efficiency of Topo IV removing the right-handed crossings of (–)-supercoiling should be higher than the efficiency of DNA gyrase introducing them. On the contrary, experimental data indicate that although Topo IV removes the left-handed crossings of (+)-supercoiling as efficiently as DNA gyrase introduces right-handed ones, DNA gyrase is $\sim 20\times$ more efficient introducing right-handed crossings than Topo IV is in removing them (5, 6, 15). For this reason, when simultaneously exposed to both enzymes, DNA would become progressively more and not less (–)-supercoiled with time.

It could also be argued that replisomes fall apart shortly after stalling in all cases. If this were true, torsional tension would equilibrate between the unreplicated and replicated regions *in vivo* but only after fork stalling. If RIs were isolated from DH5 α F' cells, the results expected would be indistinguishable from those observed if the forks swivel regardless of fork stalling (second possibility). The tug-of-war between DNA gyrase and Topo IV would turn RIs neither saturated with (–)-supercoiling in the unreplicated region nor heavily precatenated in the replicated one. If RIs were isolated from parE10 cells grown at the nonpermissive temperature, they would end-up saturated with (–)-supercoiling in the unreplicated region and heavily precatenated in the replicated one, too. In other words, the results would be identical regardless whether replication forks

swivel freely always or only after replisomes fall apart due to fork stalling. The crucial question is then how stable replisomes are after fork stalling? In other words, do replisomes stay attached to the RIs' impeding fork swiveling long enough after stalling *in vivo* or do they disassemble quickly after stalling, thus allowing forks to swivel right away? This question has been approached in many laboratories in different systems. It is important to make a clear distinction between stalling of replication forks due to “accidental” or “natural” barriers (64). Nowadays it is generally accepted that the encounter of a replication fork with a damaged DNA template stalls the replisome and causes it to fall apart (65, 66). Moreover, stalling of replication forks at the so-called natural barriers, such as the Ter-TUS complex during replication in *E. coli* cells, seems to be different (67, 68). Replication forks are blocked by TUS-bound Ter sites on the approach from one direction but not the other. In the former case, establishment of a stable locked complex involving a cytosine-specific pocket on the surface of TUS, explains TUS's resistance to dissociation from Ter sites and the strength of the Ter-TUS locks that are readily unlocked only when a later-arriving replication fork approaches the permissive face of the Ter-TUS complex (69, 70). In addition, it was clearly shown that the DnaB helicase, which leads the replisome during replication, physically interacts with TUS and stabilizes it. This protein-protein interaction was confirmed *in vivo* and *in vitro* (71). Altogether, these observations indicate that replisomes stalled at Ter-TUS complexes in the right orientation are fairly stable supporting the rationale of our approach.

We propose there are significant differences in the catalytic rate of DNA gyrase and Topo IV on the different substrates analyzed here. To confirm this idea, we investigated torsional tension in the RIs of pBR-TerE@AatII isolated from *E. coli* SD108 (topA + *gyrB225*). These cells have an attenuated DNA gyrase (72). To this end, as SD108 cells are RecA⁺, we analyzed the corresponding RIs in two-dimensional gels where the second dimension occurred in the presence of 5 μ g/ml chloroquine. The results obtained are shown in Fig. 8A. Notice that RIs were more relaxed when isolated from SD108 cells, which

F8

DNA Topology during Replication

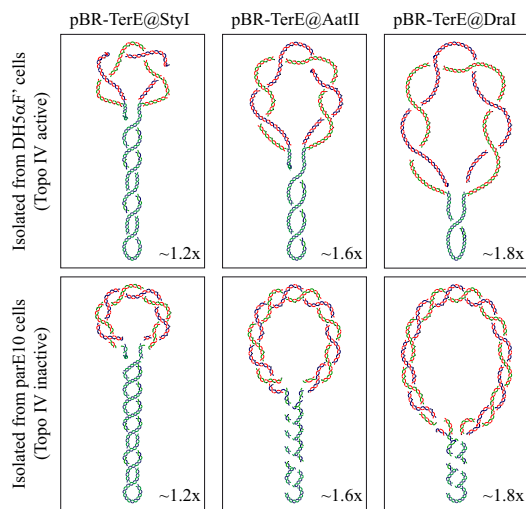


FIGURE 9. Schematics illustrating the differences observed in the degree and distribution of torsional tension in the unreplicated and replicated regions of the three plasmids isolated from either DH5αF' or parE10 cells. Note that for pBR-TerE@Styl, most of the crossings are supercoils. There is an even distribution of supercoils and precatenanes for pBR-TerE@AatII, and most of the crossings are precatenanes for pBR-TerE@DraI. In addition, the overall torsional tension is significantly higher for those RIs isolated from parE10 cells (where Topo IV is inactive) as compared with the RIs of the same plasmid isolated from DH5αF' cells (where Topo IV is active).

bears an attenuated version of DNA gyrase, than when they were isolated from cells with a wild-type version of this topoisomerase (W3110 cells in Fig. 8B). This observation confirmed that the catalytic rate of DNA topoisomerases is crucial to determine torsional tension during replication.

In summary, here we used three different and independent criteria to show that *in vivo* the RIs isolated from DH5αF' cells are less torsionally tensioned than those isolated from parE10 cells (Fig. 9). This observation strongly favors the idea that replication forks do swivel *in vivo* leading to the formation of precatenanes as replication progresses.

Acknowledgments—We acknowledge Lynn Zechiedrich, Ken Mariani, Santiago Rodríguez de Córdoba, Ian Grainge, and Nancy Crisona for *E. coli* strains. We thank María-Luisa Martínez-Robles for technical advice, and we also want to stress that we could not have accomplished this work without the continuous support and constructive criticism of Andrzej Stasiak.

REFERENCES

- Bliska, J. B., and Cozzarelli, N. R. (1987) Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **194**, 205–218
- Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E. H., and Bates, A. D. (1994) The twist, writhe, and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. Possible implications for DNA structure *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **235**, 825–847
- Funnell, B. E., Baker, T. A., and Kornberg, A. (1987) *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **262**, 10327–10334
- Marians, K. J., Minden, J. S., and Parada, C. (1986) Replication of superhelical DNAs *in vitro*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **33**, 111–140
- Crisona, N. J., Strick, T. R., Bensimon, D., Croquette, V., and Cozzarelli, N. R. (2000) Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev.* **14**, 2881–2892

- Hiasa, H., and Mariani, K. J. (1996) Two distinct modes of strand unlinking during θ -type DNA replication. *J. Biol. Chem.* **271**, 21529–21535
- Kanaar, R., and Cozzarelli, N. R. (1992) Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 369–379
- Schwartzman, J. B., and Stasiak, A. (2004) A topological view of the replicon. *EMBO Rep.* **5**, 256–261
- Alexandrov, A. I., Cozzarelli, N. R., Holmes, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Postow, L., Rybenkov, V., and Vologodskii, A. V. (1999) Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication. *Genetica* **106**, 131–140
- Peter, B. J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Mariani, K. J., and Cozzarelli, N. R. (1998) The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* **94**, 819–827
- Ullsperger, C., Vologodskii, A. A., and Cozzarelli, N. R. (1995) in *Nucleic Acids and Molecular Biology* (Lilley, D. M., and Eckstein, F., eds) pp. 115–142, Springer-Verlag, Berlin
- Bates, A. D., and Maxwell, A. (2005) *DNA Topology*, Oxford University Press, Oxford
- Wang, J. (2009) *Untangling the Double Helix*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Zechiedrich, E. L., and Cozzarelli, N. R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9**, 2859–2869
- Stone, M. D., Bryant, Z., Crisona, N. J., Smith, S. B., Vologodskii, A., Bustamante, C., and Cozzarelli, N. R. (2003) Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8654–8659
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3872–3876
- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B., and Cozzarelli, N. R. (1992) The role of topoisomerase-IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* **71**, 277–288
- Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2003) Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9820–9825
- Espeli, O., and Mariani, K. J. (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol. Microbiol.* **52**, 925–931
- Liu, Z., Zechiedrich, L., and Chan, H. S. (2010) Action at hooked or twist-hooked DNA juxtapositions rationalizes unlinking preference of type-2 topoisomerases. *J. Mol. Biol.* **400**, 963–982
- Neuman, K. C., Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2009) Mechanisms of chiral discrimination by topoisomerase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6986–6991
- Timis, Y. (2011) Local sensing of global DNA topology: from crossover geometry to type II topoisomerase processivity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8665–8676
- Trigueros, S., Salceda, J., Bermúdez, I., Fernández, X., and Roca, J. (2004) Asymmetric removal of supercoils suggests how topoisomerase II simplifies DNA topology. *J. Mol. Biol.* **335**, 723–731
- Champoux, J. J., and Been, M. D. (1980) in *Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetic Recombination* (Alberts, B., ed) pp. 809–815, Academic Press, New York
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., and Cozzarelli, N. R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**, 2580–2592
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., and Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**, 393–404
- Levine, C., Hiasa, H., and Mariani, K. J. (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**, 29–43
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Schmid, M. B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Cozzarelli, N. R. (2000) Analysis of topoisomerase function in

DNA Topology during Replication

- bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9419–9424
29. López, V., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2012) Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3563–3573
 30. Postow, L., Peter, B. J., and Cozzarelli, N. R. (1999) Knot what we thought before: the twisted story of replication. *BioEssays* **21**, 805–808
 31. Bastia, D., and Mohanty, B. K. (1996) in *DNA Replication in Eukaryotic Cells* (DePamphilis, M. L., ed) pp. 177–215, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
 32. Hill, T. M., Pelletier, A. J., Tecklenburg, M. L., and Kuempel, P. L. (1988) Identification of the DNA sequence from *E. coli* terminus region that halts replication forks. *Cell* **55**, 459–466
 33. Ullsperger, C., and Cozzarelli, N. R. (1996) Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 31549–31555
 34. Cesareni, G., Helmer-Citterich, M., and Castagnoli, L. (1991) Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* **7**, 230–235
 35. Tomizawa, J., and Som, T. (1984) Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein. *Cell* **38**, 871–878
 36. Santamaría, D., Hernández, P., Martínez-Robles, M. L., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2000) Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented ColE1 origins. *J. Mol. Biol.* **300**, 75–82
 37. Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M. L., Sogo, J. M., Stasiak, A., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2002) Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acids Res.* **30**, 656–666
 38. Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980) Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* **21**, 103–114
 39. Sundin, O., and Varshavsky, A. (1981) Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* **25**, 659–669
 40. Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2002) Knotting dynamics during DNA replication. *Mol. Microbiol.* **46**, 699–707
 41. Santamaría, D., de la Cueva, G., Martínez-Robles, M. L., Krimer, D. B., Hernández, P., and Schwartzman, J. B. (1998) DnaB helicase is unable to dissociate RNA-DNA hybrids—Its implication in the polar pausing of replication forks at ColE1 origins. *J. Biol. Chem.* **273**, 33386–33396
 42. Schwartzman, J. B., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., and Krimer, D. B. (2013) Plasmid DNA topology assayed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **1054**, 121–132
 43. Olavarrieta, L., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2002) DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J. Mol. Biol.* **322**, 1–6
 44. Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D. M., and Cozzarelli, N. R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 8103–8113
 45. Martínez-Robles, M. L., Witz, G., Hernández, P., Schwartzman, J. B., Stasiak, A., and Krimer, D. B. (2009) Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5126–5137
 46. Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M. L., and Schwartzman, J. B. (1991) Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **220**, 843–853
 47. Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M. L., and Schwartzman, J. B. (1992) Initiation of DNA replication in ColE1 plasmids containing multiple potential origins of replication. *J. Biol. Chem.* **267**, 22496–22505
 48. Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., and Hyrien, O. (2001) Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J.* **20**, 6509–6519
 49. Martín-Parras, L., Lucas, I., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., Hyrien, O., and Schwartzman, J. B. (1998) Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3424–3432
 50. Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D. B., Stasiak, A., and Schwartzman, J. B. (2007) Topological locking restrains replication fork reversal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1500–1505
 51. Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R. W., Bustamante, C., Vologodskii, A. V., and Cozzarelli, N. R. (2001) Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J. Biol. Chem.* **276**, 2790–2796
 52. De Septenville, A. L., Duigou, S., Boubakri, H., and Michel, B. (2012) Replication fork reversal after replication-transcription collision. *PLoS Genet.* **8**, e1002622
 53. Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2007) Replication fork reversal occurs spontaneously after digestion but is constrained in supercoiled domains. *J. Biol. Chem.* **282**, 18190–18196
 54. Mayán-Santos, M. D., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D., and Schwartzman, J. B. (2007) DNA is more negatively supercoiled in bacterial plasmids than in minichromosomes isolated from budding yeast. *Electrophoresis* **28**, 3845–3853
 55. Schwartzman, J. B., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., and Krimer, D. B. (2013) The benefit of DNA supercoiling during replication. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 646–651
 56. Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A. (2011) DNA knots and DNA supercoiling. *Cell Cycle* **10**, 1339–1340
 57. Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A. (2011) Tightening of DNA knots by supercoiling facilitates their unknotting by type II DNA topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 3608–3611
 58. Witz, G., and Stasiak, A. (2010) DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2119–2133
 59. Katritch, V., Bednar, J., Michoud, D., Scharein, R. G., Dubochet, J., and Stasiak, A. (1996) Geometry and physics of knots. *Nature* **384**, 142–145
 60. Sogo, J. M., Stasiak, A., Martínez-Robles, M. L., Krimer, D. B., Hernández, P., and Schwartzman, J. B. (1999) Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **286**, 637–643
 61. Viguera, E., Hernández, P., Krimer, D. B., Boistov, A. S., Lurz, R., Alonso, J. C., and Schwartzman, J. B. (1996) The ColE1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J. Biol. Chem.* **271**, 22414–22421
 62. Higgins, N. P., and Vologodskii, A. (eds) (2004) *Topological Behavior of Plasmid DNA*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 63. Cebrian, J., Kadomatsu-Hermosa, M. J., Castan, A., Martínez, V., Parra, C., Fernandez-Nestosa, M. J., Schaefer, C., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., Stasiak, A., and Schwartzman, J. B. (2014) Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **10.1093/nar/gku1255**
 64. Mirkin, E. V., and Mirkin, S. M. (2007) Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 13–35
 65. Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., and Mariani, K. J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**, 37–41
 66. Mariani, K. J. (2000) PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 185–189
 67. Bidnenko, V., Ehrlich, S. D., and Michel, B. (2002) Replication fork collapse at replication terminator sequences. *EMBO J.* **21**, 3898–3907
 68. Labib, K., and Hodgson, B. (2007) Replication fork barriers: pausing for a break or stalling for time? *EMBO Rep.* **8**, 346–353
 69. Mulcair, M. D., Schaeffer, P. M., Oakley, A. J., Cross, H. F., Neylon, C., Hill, T. M., and Dixon, N. E. (2006) A molecular mousetrap determines polarity of termination of DNA replication in *E. coli*. *Cell* **125**, 1309–1319
 70. Moreau, M. J., and Schaeffer, P. M. (2012) Differential Tus-Ter binding and lock formation: implications for DNA replication termination in *Escherichia coli*. *Mol. Biosyst.* **8**, 2783–2791
 71. Mulugu, S., Potnis, A., Shamsuzzaman, Taylor, J., Alexander, K., and Bastia, D. (2001) Mechanism of termination of DNA replication of *Escherichia coli* involves helicase-contrahelicase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9569–9574
 72. DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E., and Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**, 43–51